

Dall'esperienza del singolo paziente ai dati dei clinical trials

29 Novembre 2016
Auditorium CAM –MONZA

Dott.ssa Cristina Ferraris



UOC Chirurgia Senologica

Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori Milano

Un approccio terapeutico multidisciplinare per donne giovani in
menopausa
indotta dal trattamento nel carcinoma mammario

Isoflavoni di Trifoglio Rosso

Isoflavoni del trifoglio rosso e carcinoma della mammella

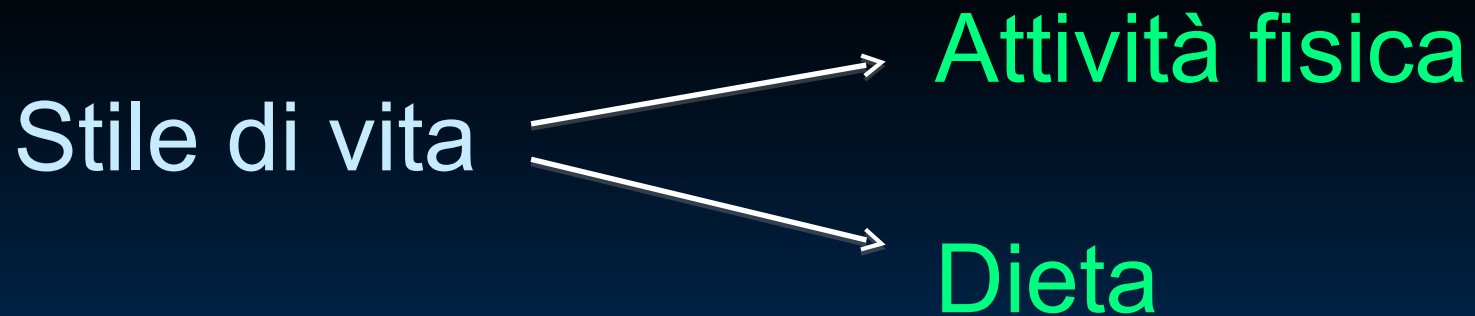
Sindrome menopausale indotta dal trattamento:

- Le cosiddette vampate
- Sudorazioni improvvise e profuse
- Variazioni dell'umore
- Facile irritabilità
- Aumento di peso
- Disturbi del sonno
- Disturbi sessuali calo del desiderio, secchezza vaginale)
- Osteoporosi

Sindrome Menopausale

trattamento

TOS ***controindicata***



Fitormoni

ATTIVITA' FISICA

Tutte le parti del corpo che hanno una funzione, se usate con continuità e moderazione, si sviluppano normalmente ed invecchiano lentamente.

Il loro non uso comporta, altresì, la predisposizione alle malattie, un ritardato accrescimento ed un precoce invecchiamento...

Clin Obst Gyn 2008
Review



CLINICAL OBSTETRICS AND GYNECOLOGY
Volume 51, Number 3, 627-641
© 2008, Lippincott Williams & Wilkins

Role of Exercise and Nutrition in Menopause

ALLISON R. HAGEY, JD, and MICHELLE P. WARREN, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, Columbia University
Medical Center, New York, New York

Abstract: Menopause and the aging process itself cause many physiologic changes, which explain the increased prevalence of chronic diseases observed in postmenopausal women. Exercise and nutrition play important roles in the prevention and treatment of cardiovascular disease, cancer, obesity, diabetes, osteoporosis, and depression.

Key words: menopause, cardiovascular disease, cancer, obesity, diabetes, osteoporosis, depression

Cardiovascular Disease and the Role of Nutrition

Cardiovascular disease (CVD) incidence increases with advancing age in women, with a notable increase after menopause, possibly as a result of estrogen deficiency. Coronary heart disease (CHD) is the leading cause of death among postmenopausal women.¹ Smoking, hypertension, hypercholesterolemia, obesity, diabetes mellitus, a sedentary lifestyle, and estrogen deficiency all increase the risk of atherosclerotic plaque formation.²

Correspondence: Michelle P. Warren, MD, Wyeth-Ayerst Professor of Women's Health, Department of Obstetrics and Gynecology, Columbia University Medical Center, 622 West 168 Street, New York, NY. E-mail: mpw1@columbia.edu

LIPIDS

CVD risk factors, such as lipid changes, become more pronounced during menopause. Postmenopausal women not only have higher total low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) plasma levels, but also the low-density lipoprotein (LDL) particle itself becomes more dense, and is linked to CHD risk.³ Patients who have both high triglyceride levels and low high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) levels have an increased incidence of CVD. Several studies indicate that low HDLc levels in women are stronger predictors of CVD mortality than total cholesterol levels.⁴ CHD in women is also more strongly related to the total cholesterol HDLc ratio than to either total cholesterol or to LDLc. The entire lipid profile should be assessed yearly and dietary and exercise interventions should be prescribed to women who are not within the range of optimal cholesterol and lipoprotein profile. As of 2001, the National Cholesterol Education Program (NCEP) suggests that people at low or moderate risk of CHD maintain LDL levels < 100-mg/dL LDLc² (Tables 1 to 3).

ATTIVITA' FISICA

- ↓ mortalità (50%) *Metanalisi, Med Sci Sports Exer, 1999*
- ↓ sintomi climaterici *Maturitas (review) 2009*
- ↓ osteoporosi *Am J Nutr, 2003; Clin Geriatr Med, 2003*
- ↓ obesità e malattie cardiovascolari *Metanalisi, Br J ports Med, 2002*
- ↓ NIDDM, ipertensione e dislipidemie *N.H.S., New Engl J Med, 1999*
- ↓ neoplasie (mammella, endometrio, colon) ?
Cancer Causes Control, 1998; New Engl J Med, 1998, J Natl Cancer Inst 2008

Dieta abituale e Ca mammario

*Numerosi lavori dimostrano prognosi
significativamente differenti sulla base di
abitudini alimentari (donne giapponesi vs
donne occidentali)*

Apporto dietetico isoflavoni stimato in differenti popolazioni

- Asiatico-cinese 25-45 mg/die
- Giapponese 200 mg/die
- Europeo 3 mg/die

(Coward 1993; Cassidy 1994)

La situazione attuale è però in rapida modificazione per il cambiamento dello stile di vita legato allo sviluppo industriale (basta una generazione), avvalorando ulteriormente l'importanza della dieta.

Am J Epidemiol 2009



American Journal of Epidemiology
© The Author 2009. Published by Oxford University Press on behalf of the Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org.

Vol. 170, No. 10
DOI: 10.1093/aje/kwz257
Advance Access publication:
October 14, 2009

Original Contribution

Postmenopausal Breast Cancer Risk and Dietary Patterns in the E3N-EPIC Prospective Cohort Study

Vanessa Cottet*, Mathilde Touvier*, Agnès Fournier, Marina S. Touillaud, Lionel Lafay, Françoise Clavel-Chapelon, and Marie-Christine Boutron-Ruault†

* Drs. Vanessa Cottet and Mathilde Touvier contributed equally to this article, and their names are given in alphabetical order.
† Correspondence to Dr. Marie-Christine Boutron-Ruault, INSERM, ERI 20, Equipe E3N, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif Cedex, France (e-mail: boutron@igr.fr).

Initially submitted April 6, 2009; accepted for publication July 23, 2009.

Since evidence relating diet to breast cancer risk is not sufficiently consistent to elaborate preventive proposals, the authors examined the association between dietary patterns and breast cancer risk in a large French cohort study. The analyses included 2,381 postmenopausal invasive breast cancer cases diagnosed during a median 9.7-year follow-up period (1993–2005) among 65,374 women from the E3N-EPIC cohort. Scores for dietary patterns were obtained by factor analysis, and breast cancer hazard ratios were estimated by Cox proportional hazards regression for the highest quartile of dietary pattern score versus the lowest. Two dietary patterns were identified: “alcohol/Western” (essentially meat products, French fries, appetizers, rice/pasta, potatoes, pulses, pizzas/pies, canned fish, eggs, alcoholic beverages, cakes, mayonnaise, and butter/cream) and “healthy/Mediterranean” (essentially vegetables, fruits, seafood, olive oil, and sunflower oil). The first pattern was positively associated with breast cancer risk (hazard ratio = 1.20, 95% confidence interval (CI): 1.03, 1.38; $P = 0.007$ for linear trend), especially when tumors were estrogen receptor-positive/progesterone receptor-positive. The “healthy/Mediterranean” pattern was negatively associated with breast cancer risk (hazard ratio = 0.85, 95% CI: 0.75, 0.95; $P = 0.003$ for linear trend), especially when tumors were estrogen receptor-positive/progesterone receptor-negative. Adherence to a diet comprising mostly fruits, vegetables, fish, and olive/sunflower oil, along with avoidance of Western-type foods, may contribute to a substantial reduction in postmenopausal breast cancer risk.

breast neoplasms; cohort studies; diet; diet, Mediterranean; factor analysis, statistical; postmenopause

Abbreviations: CI, confidence interval; ER, estrogen receptor; HR, hazard ratio; PR, progesterone receptor.

Breast cancer incidence varies widely between countries, suggesting the influence of environmental factors. The Japanese have traditionally been at low risk of breast cancer (1), but breast cancer incidence in Japan has recently increased (2) concomitantly with major changes in traditional habits, especially diet (3). Indeed, during the past 50 years in Japan, the proportion of energy obtained from fat increased until it represented up to 25% of total energy, and the consumption of dairy products increased 10-fold (4). Thus, the increasing incidence of breast cancer in Japan can be attributed at least partly to the adoption of a Western diet, which is notably characterized by higher intakes of meat, dairy products, and saturated fat, and decreased consumption of traditional Japa-

nese foods such as seafood products (3). However, to date, evidence for associations between breast cancer risk and specific foods or nutrients has been limited, except for alcohol (5).

The recent approach to dietary patterns (6) classifies subjects according to dietary behavior and facilitates public health recommendations; in contrast, the nutrient/food approach permits better assessment of biologic mechanisms involved (7). Several epidemiologic studies have investigated the association between dietary pattern and breast cancer risk (8). A significant inverse relation has been described between breast cancer risk and a “prudent” (9, 10) or “healthy” (11) dietary pattern and specific regional patterns (12–14), in contrast to positive associations with

Am J Clin Nutr 2009

National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study

Dietary fiber intake and risk of breast cancer in postmenopausal women: the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study^{1–4}

Yikyung Park, Louise A. Brinton, Amy F. Subar, Albert Hollenbeck, and Arthur Schatzkin

ABSTRACT

Background: Although dietary fiber has been hypothesized to lower risk of breast cancer by modulating estrogen metabolism, the association between dietary fiber intake and risk of breast cancer by hormone receptor status is unclear.

Objective: The objective was to examine the relation of dietary fiber intake to breast cancer by hormone receptor status and histologic type among postmenopausal women in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study ($n = 185,598$; mean age: 62 y).

Design: Dietary intakes were assessed with a food-frequency questionnaire. Incident breast cancer cases were identified through linkage with state cancer registries. Cox proportional hazard models were used to estimate relative risks (RRs) and 2-sided 95% CIs.

Results: During an average of 7 y of follow-up, 5461 breast cancer cases were identified, of which 3341 cases had estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) status. Dietary fiber intake was inversely associated with breast cancer risk [RR for the highest quintile (Q5) compared with the lowest quintile (Q1): 0.87; 95% CI: 0.77, 0.98; P for trend: 0.02]. The inverse association appeared to be stronger for ER+/PR+ tumors (RR_{Q5vsQ1}: 0.56; 95% CI: 0.35, 0.90; P for trend: 0.008; 366 cases) than for ER+/PR- tumors (RR_{Q5vsQ1}: 0.95; 95% CI: 0.76, 1.20; P for trend: 0.47; 1641 cases). The RR_{Q5vsQ1} of lobular tumors was 0.66 (95% CI: 0.44, 0.97; P for trend: 0.04), and the RR_{Q5vsQ1} of ductal tumors was 0.90 (95% CI: 0.77, 1.04; P for trend: 0.10). Fiber from grains, fruit, vegetables, and beans was not related to breast cancer.

Conclusion: Our findings suggest that dietary fiber can play a role in preventing breast cancer through nonestrogen pathways among postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2009;90:664–71.

INTRODUCTION

Breast cancer, the most common cancer in women worldwide, is a hormone-related malignancy. Reproductive factors and body fatness, which affect estrogen, progesterone, and insulin status, have been identified as risk factors for breast cancer (1). In addition, intakes of dietary fat and alcohol, which have been implicated in estrogen metabolism, have been related to an increased risk of breast cancer (1).

More than 2 decades ago, dietary fiber was hypothesized to lower the risk of breast cancer, based on findings suggesting that vegetarian women had increased fecal excretion of estrogens and decreased plasma concentration of estrogen compared with

omnivorous women (2). Dietary fiber could protect against breast cancer through inhibition of the intestinal reabsorption of estrogens excreted by the biliary system and an increase in fecal excretion of estrogens; both mechanisms could lower circulating estrogen concentrations (2–4). In addition, dietary fiber could play a role in modulating insulin resistance and insulin-like growth factors, which have been associated with breast cancer risk (5–7).

Observational epidemiologic studies, however, have reported inconsistent findings. A meta-analysis of 12 case-control studies (8) found that dietary fiber intake was significantly inversely associated with risk of breast cancer in postmenopausal women [relative risk (RR): 0.85 for a 20-g/d increment of dietary fiber intake; $P = 0.02$]. However, most prospective cohort studies have found no association between dietary fiber and breast cancer risk (9–15). A few cohort studies observed a suggestive inverse association between dietary fiber and breast cancer in premenopausal (14) and postmenopausal (16, 17) women. These inconsistent results may be explained, in part, by breast cancer heterogeneity. If the relation of dietary fiber to breast cancer differed by breast cancer hormone receptor status (eg, both estrogen and progesterone negative), both estrogen and progesterone negative) or by histologic type (eg, ductal tumor, lobular tumor), examinations of total breast cancer may have missed breast cancer subtype-specific associations. Moreover, associations with breast cancer may differ by type of dietary fiber (eg, soluble and insoluble fiber) as well as specific food sources of fiber. We therefore examined among postmenopausal women in a large prospective cohort study whether total dietary

¹ From the Divisions of Cancer Epidemiology and Genetics (YP, LAB, and AS) and Cancer Control and Population Sciences (AFS), National Cancer Institute, Bethesda, MD, and the AARP, Washington, DC (AH).

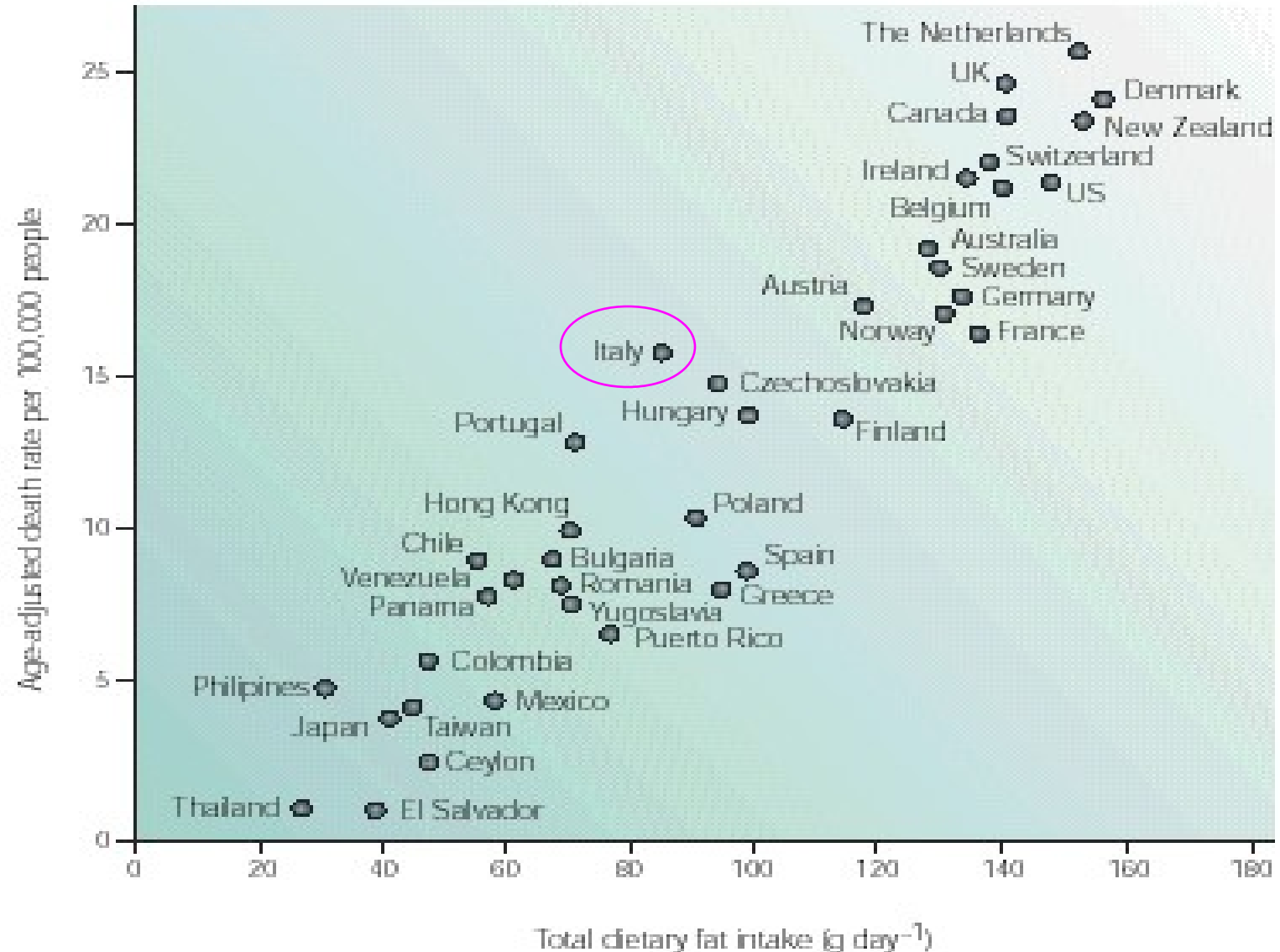
² The views expressed herein are solely those of the authors and do not necessarily reflect those of the Florida Cancer Data System or the Florida Department of Health. The Pennsylvania Department of Health specifically disclaims responsibility for any analyses, interpretations, or conclusions.

³ Address correspondence to Y. Park, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, 6120 Executive Boulevard, Rockville, MD 20852. E-mail: parkyk@mail.nih.gov.

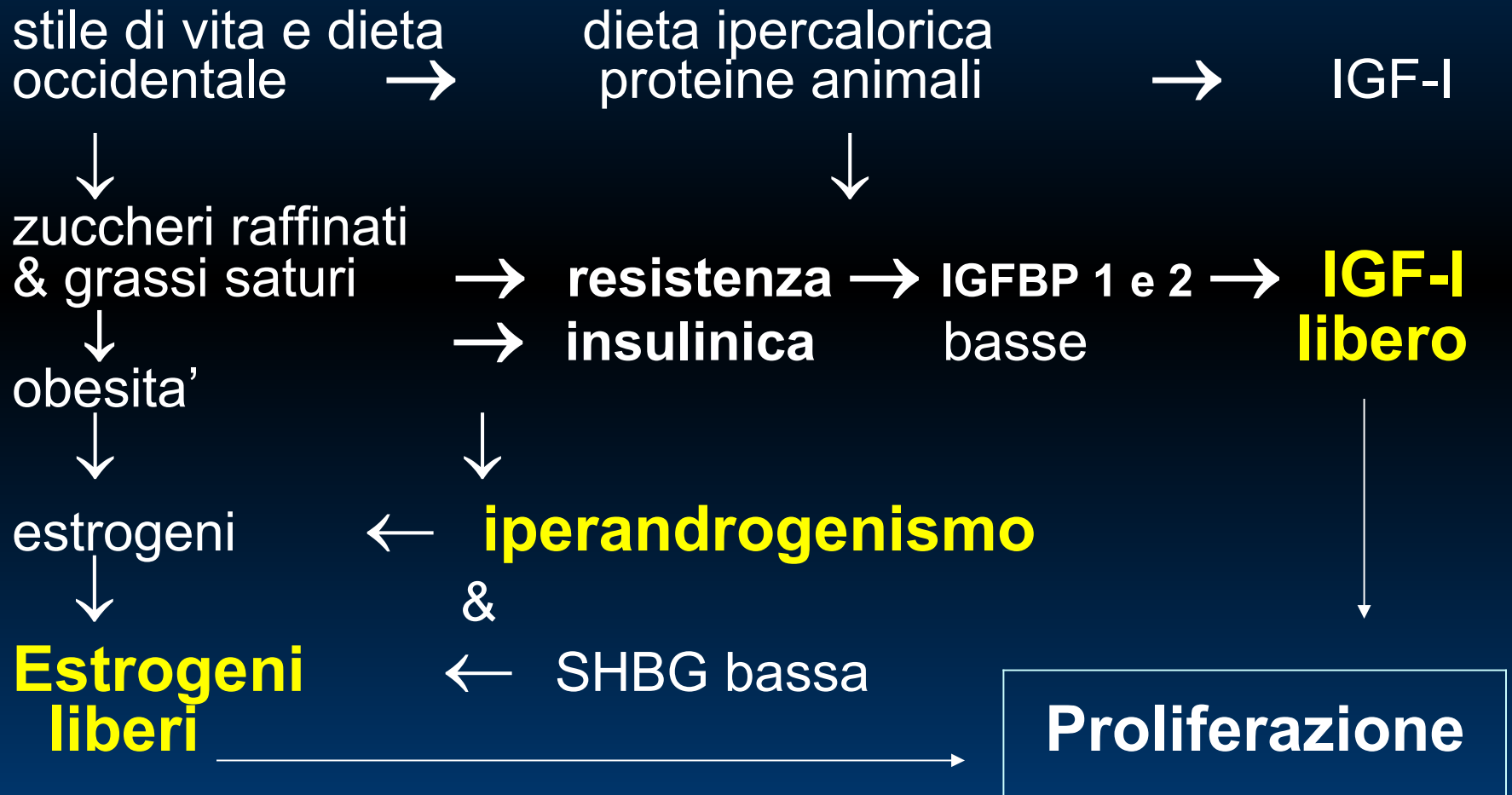
⁴ Received March 10, 2009. Accepted for publication June 23, 2009. First published online July 22, 2009; doi: 10.3945/ajcn.2009.27758.



Correlazione tra assunzione di grassi e mortalità per ca mammella



Meccanismi che legano la dieta e il rischio di carcinoma mammario



DIANA-1: effetti di 4,5 mesi di dieta

	Cambiam ento%	P		Cambiam ento%	P
SHBG	+ 25.2	0.0001	glicemia	-5.7	0.026
Testosterone	-18.3	0.0040	Area glicemica	+4.8	0.85
Estradiolo	-18.0	0.1300	GH	+54.2	0.22
Testosterone libero	-28.6	<0.0001	GHBP	+29.1	0.002
Estradiolo libero	-23.4	0.0500	IGF-1	-5.9	0.64
Insulina	-10.4	0.1400	IGFBP-1	+12.2	0.015
Area insulinica	-7.7	0.0404	IGFBP-2	+30.4	0.0004
C-Peptide	-19.1	0.03	IGFBP-3	-4.5	0.21

ORDET: Dieta e carcinoma mammario

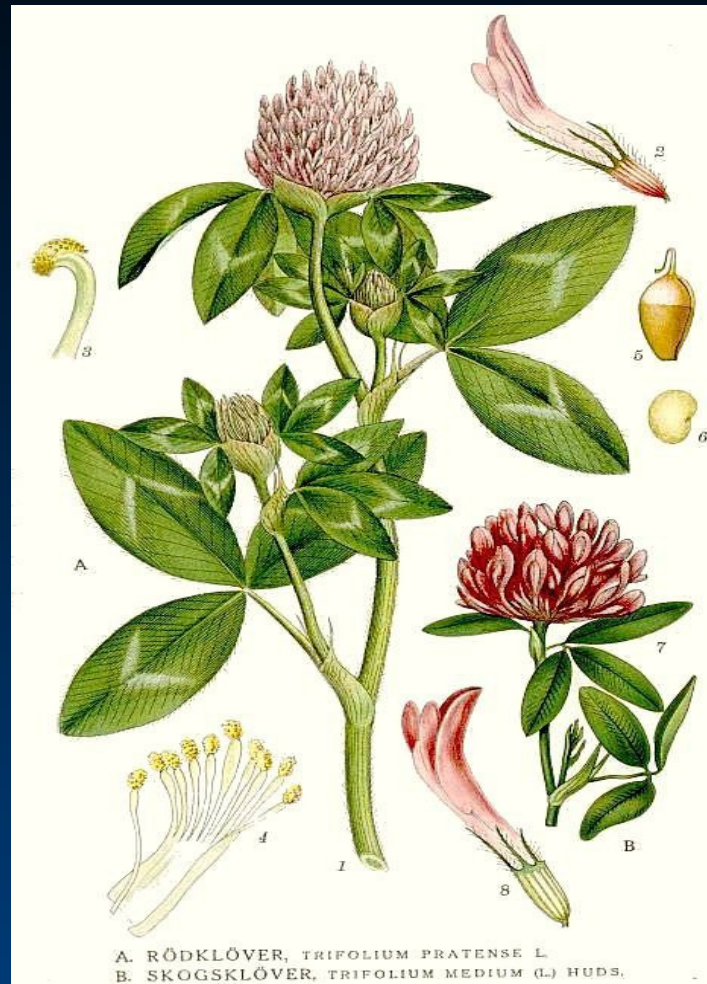
Aumentano il rischio

- Grassi totali
- Proteine animali
- Indice glicemico
- Pressione arteriosa
- Circonferenza vita

Riducono il rischio

- Carboidrati totali
- Pattern vegetariano
- Indice antiossidante
- (Omega-3)

TRIFOGLIO ROSSO



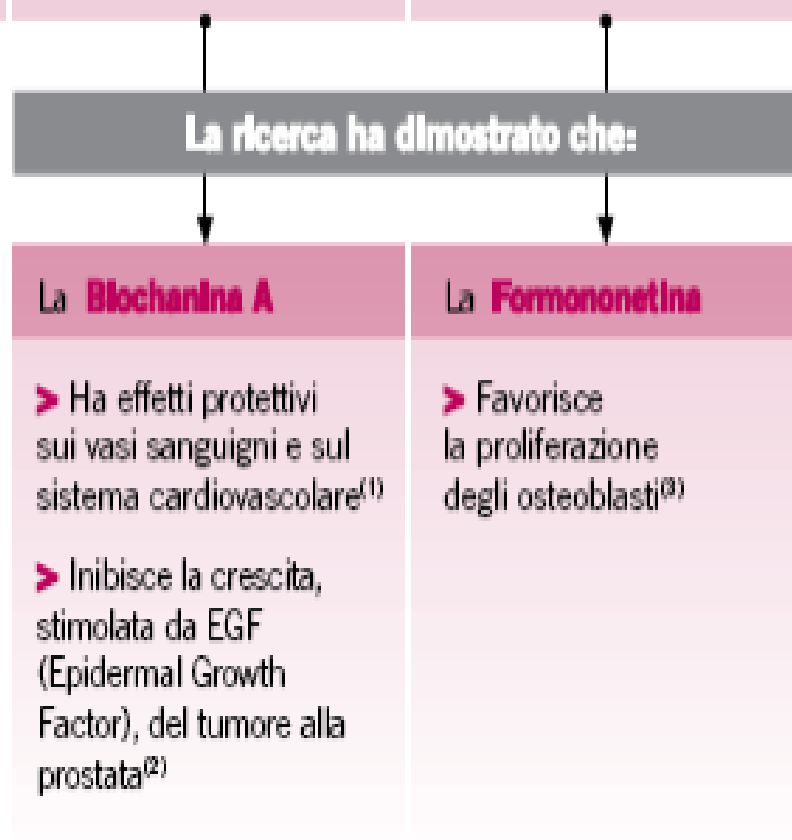
Composizione

Sola	Genisteina	Daidzeina	–	–
Trifoglio rosso	Genisteina	Daidzeina	Biochanina A	Formononetina

E' ormai ampiamente noto che l'azione degli isoflavoni si esplica non solo con il metabolita finale (equolo) ma anche, e soprattutto, attraverso l'azione pleiotropica dei precursori presenti.

Bibliografia

1. Muir MM, Siva D, Dai D, Mason RS. The Effect of Isoflavones on Human Osteoblast Proliferation, Activity and Life-span in vitro. Presented at Menopause 2002, 24-26th October, Sydney, NSW, Australia.
2. Dubey RK, Gillespie DG, Imthurn B, Rosselli M, Jackson EK and Keller PJ. Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. Hypertension 1999; 33 (1 Pt 2):177-82.
3. Peterson G and Barnes S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. Prostate 1993; 22(4):335-45.



Struttura

Trifoglio rosso

Quantità di
isoflavoni **Ingerita**

40mg
isoflavoni

Nel **Trifoglio rosso**
gli isoflavoni sono
presenti in forma di
agliconi (privi della
parte zuccherina)

Quantità di
isoflavoni **In circolo**

40mg
isoflavoni attivi



- > La quantità di fitoestrogeni dichiarata in Promensil (40 mg o 80 mg) riguarda la sola componente fitormonale, l'unica attiva.
- > Gli isoflavoni del Trifoglio rosso non necessitano di alcuna idrolisi enzimatica preliminare, a livello intestinale, ed entrano in circolo dopo soli 15 minuti dall'assunzione.

Soya

Quantità di
isoflavoni **Ingerita**

40mg
isoflavoni

Nella **Soia** gli
isoflavoni sono
presenti in forma
gliconata

Quantità di
isoflavoni **In circolo**

25mg
isoflavoni attivi

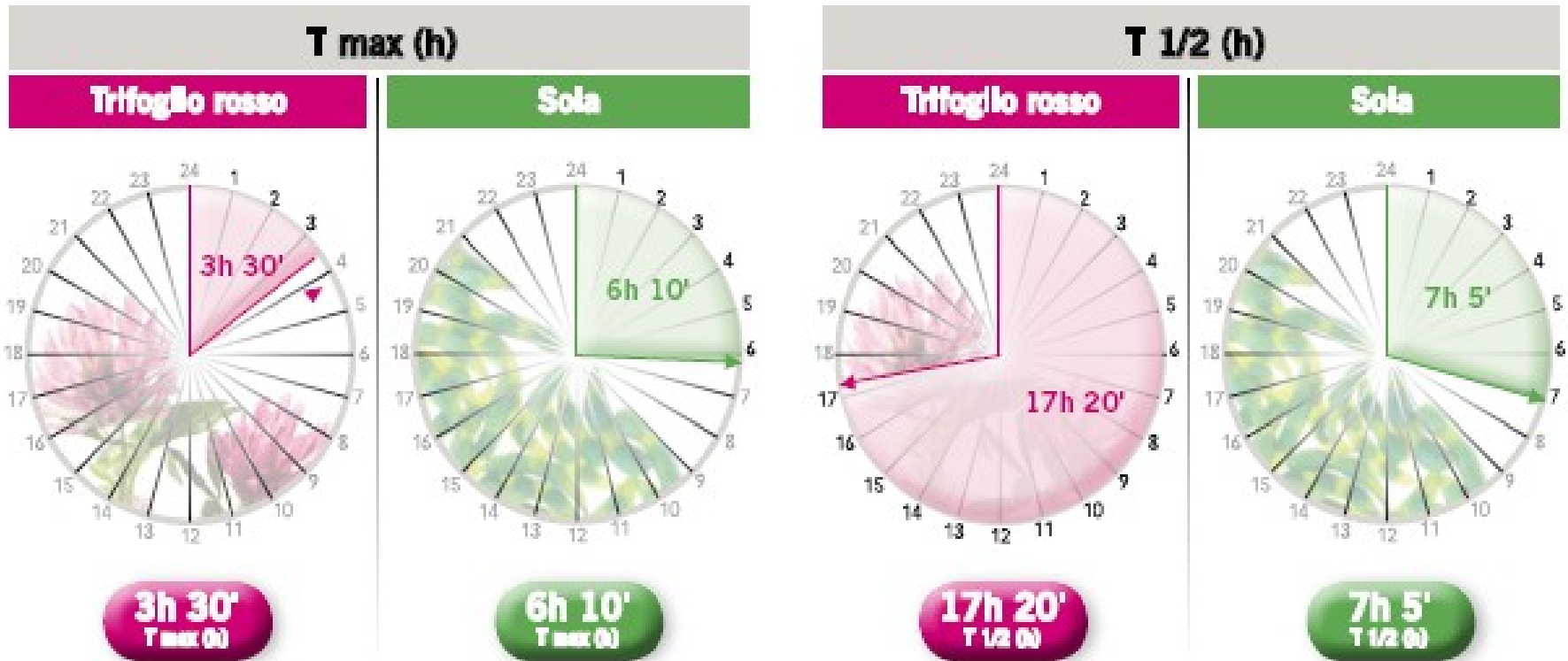
+

15mg
zuccheri



- > La quantità di fitoestrogeni dichiarata in confezione comprende anche l'inutile parte zuccherina (40 mg di fitoestrogeni gliconati = circa 20 mg di isoflavoni attivi).
- > Gli isoflavoni della soia necessitano di idrolisi enzimatica preliminare a livello intestinale.

Farmacocinetica



T max: tempo di raggiungimento della massima concentrazione ematica (in ore)
T 1/2: tempo di dimezzamento della massima concentrazione ematica (in ore)

Bibliografia

1. Dornstauder E. "Estrogenic activity of two standardized red clover extracts intended for large scale use in hormone replacement therapy". *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2001; 78(1):67-75
2. Howes J. "Long-term pharmacokinetics of an extract of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*)". *J. Altern. Complement Med* 2002 Apr; 8(2):135-42
3. Watanabe S. "Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma and urine feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako)". *J. Nutr.* 1998 Oct; 128(10): 1710-5

Effetti degli isoflavoni del Trifoglio rosso sui sintomi, sui lipidi e sulla vagina nelle donne durante la menopausa

Hidalgo L. A. et al, The effect of red clover isoflavones on menopausal symptoms, lipids and vaginal cytology in menopausal women: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Gynec. Endocr.* 2005, 21: 257-264

> Background:

I risultati inattesi dello studio Women's Health Initiative hanno ridotto l'uso della HRT convenzionale, modificando la considerazione sulla stessa sia degli specialisti sia delle pazienti ed aumentando l'interesse per opzioni alternative.

> Obiettivi:

Valutare gli effetti degli isoflavoni contenuti nel Trifoglio rosso sui sintomi, sui lipidi e sulla vagina di donne in menopausa.

> Metodi:

60 donne in menopausa (età superiore ai 40 anni) che non usavano HRT, con un indice di Kupperman maggiore o eguale a 15, sono state randomizzate in doppio cieco per ricevere 80 mg di isoflavoni da Trifoglio rosso o un placebo per 90 giorni. Successivamente, dopo un periodo di 7 giorni di wash out, le pazienti hanno ricevuto il trattamento alternativo per altri 90 giorni. Valutazioni sintomatologiche con indice di Kupperman, dosaggi ematici e prelievi citologici vaginali sono stati effettuati al tempo zero, dopo 90 giorni e dopo 180 giorni.

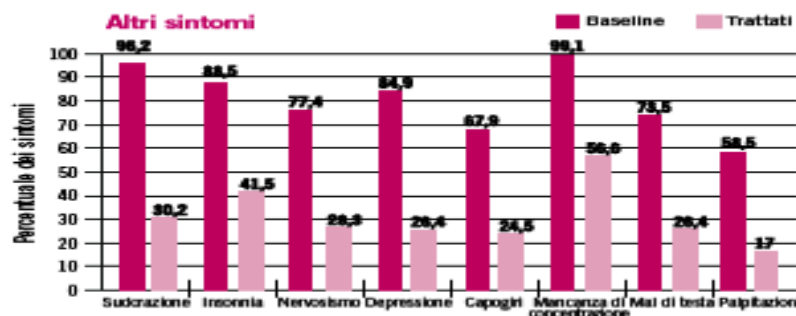
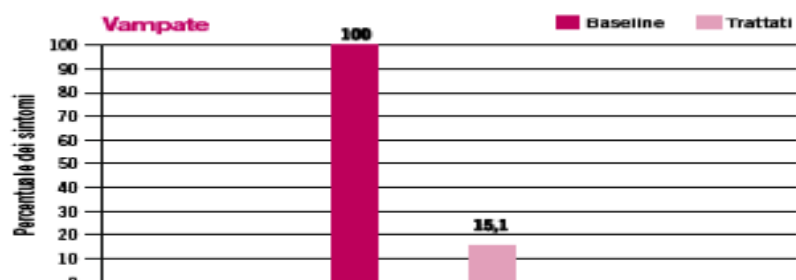
> Risultati:

53 donne (83,3%) hanno completato la ricerca. L'età media era di $51,3 \pm 3,5$ anni. Non si è riscontrato nessun effetto significativo su BMI, peso corporeo e pressione arteriosa in nessuna fase di trattamento. Il punteggio dell'indice di Kupperman è diminuito significativamente dopo ogni trattamento, in maniera più importante nel gruppo trattato con Trifoglio rosso rispetto al gruppo placebo.

Indice di Kupperman

Baseline	$27,2 \pm 7,7$
Isoflavoni	$5,9 \pm 3,9$ ($p < 0,05$)
Placebo	$20,9 \pm 5,3$

L'integrazione con Trifoglio rosso ha ridotto quindi in entità significativa la sommatoria dei sintomi menopausali ed ha avuto un effetto positivo sulla vagina come quantificato, dall'aumento di tutti gli indici, da tampone vaginale: percentuale di cellule squamose con picnosi nucleare, con acidofilia citoplasmatica (indice di cornificazione) e percentuale di cellule basali (indice di maturazione). Sono diminuiti anche i valori di colesterolo totale, dell'LDL-colesterolo e dei trigliceridi, quest'ultimo parametro in maniera significativa rispetto al gruppo placebo.



> Conclusioni:

comparando al placebo un'integrazione di isoflavoni da Trifoglio rosso in donne in post-menopausa, si è rilevato che il trattamento ha ridotto in maniera significativa i sintomi ed ha mostrato effetti positivi sulla vagina e sui livelli dei trigliceridi.

Effetto degli isoflavoni ottenuti da Trifoglio rosso sul profilo lipidico di donne in post-menopausa con un elevato Indice di massa corporea

Chedraui P., San Miguel G., Hidalgo L., Morocho N., Ross S. Effect of Trifolium pratense-derived isoflavones on the lipid profile of postmenopausal women with increased body mass Index. *Ginecol. Endocr.* 2008; 24, 620-624

> Obiettivi:

Diversi dati epidemiologici indicano che il rischio cardiovascolare aumenta con l'arrivo della menopausa, una situazione direttamente correlata ad un aumento della sindrome metabolica.

E' stato inoltre precedentemente riportato che l'obesità gioca un ruolo centrale come fattore di rischio per l'insorgenza della sindrome metabolica in donne in post-menopausa. Considerando quindi l'elevato rischio cardiovascolare di questo tipo di donne, è di grande interesse studiare gli effetti degli isoflavoni, sostanze naturali simil-estrogeniche, su queste problematiche, già note per la loro capacità di alleviare i sintomi tipici della menopausa.

> Protocollo dello studio:

60 donne, con le seguenti caratteristiche, sono state arruolate per questo studio:

Post-menopausa accertata

Età: 50 anni

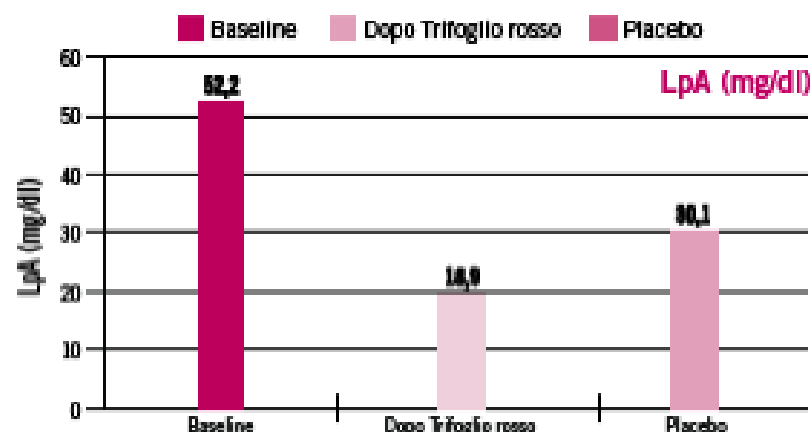
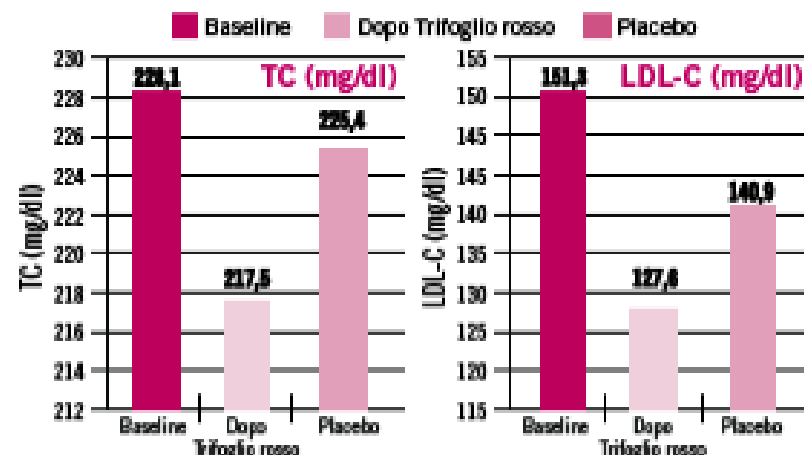
BMI: ≥ 25

Indice di Kupperman: ≥ 15

Le donne sono state divise in due gruppi e sono state trattate per un periodo di 90 giorni con un estratto di 80 mg di isoflavoni da Trifoglio rosso, o placebo. Dopo un periodo di wash-out di 7 giorni il trattamento è stato invertito per ulteriori 90 giorni (cross-over).

> Risultati:

Il presente studio ha mostrato che la supplementazione di Trifoglio rosso ha diminuito il livello di trigliceridi totali del 4,6%, le LDL-C del 15,6% e le LpA del 63,8%.





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb



Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites

Angelika Pfitscher^{a,b}, Evelyne Reiter^{a,b}, Alois Jungbauer^{a,b,*}

^a Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria

^b Christian-Doppler-Laboratory of Receptor Biotechnology, Muthgasse 18, 1190 Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2008

Received in revised form 22 August 2008

Accepted 28 August 2008

Keywords:

Red clover

Isoflavones

Metabolites

Transactivation

Estrogen receptor

Angolensin

3'-Hydroxygenistein

ABSTRACT

Red clover extracts contain a variety of isoflavones, which have affinity toward estrogen receptor alpha (ER α), estrogen receptor beta (ER β), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR). Upon ingestion, they undergo various metabolic transformations. For a complete evaluation of red clover extracts and possible health benefits, the resulting metabolites should also be investigated. Biochanin A, formononetin, genistein, daidzein, dihydrobiochanin A, dihydroformononetin, dihydrogenistein, dihydrodaidzein, 3'-hydroxygenistein, 6-hydroxydaidzein, 6-hydroxydesmethylangolensin, equol, O-desmethylangolensin, angolensin, and p-ethylphenol were tested for their transactivation potential toward ER α , AR, and PR in yeast. Competitive binding assays with radiolabeled 17 β -estradiol, 17 α -methyltrienolone or progesterone assessed binding to the respective ER α and ER β , AR, and PR. The compounds showed only weak binding affinity to AR and PR, with IC₅₀ values being greater (i.e., lesser affinity) than 10⁻⁵ M for the respective receptor. So far, beneficial health effects have been attributed to the production of equol. We propose that other metabolites can also contribute to these effects. However, more detailed information for the formation of these metabolites in humans and for bioavailability data are required to confirm our assumptions.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

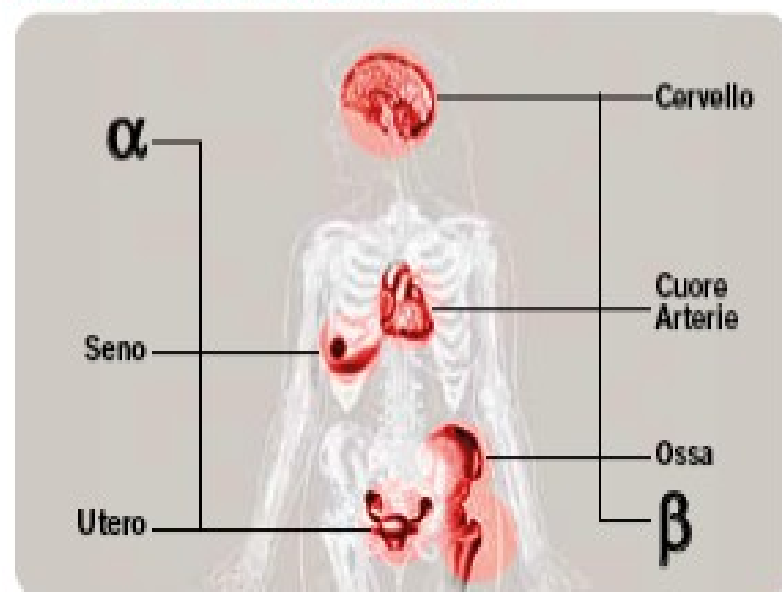
Sicurezza degli isoflavoni del Trifoglio rosso

Il Trifoglio rosso è l'alternativa alla Terapia Ormonale Sostitutiva (TOS)

Gli isoflavoni, contenuti nell'estratto di Trifoglio rosso, interagiscono con i recettori estrogenici esplicando un'attività regolatoria, contemporaneamente:

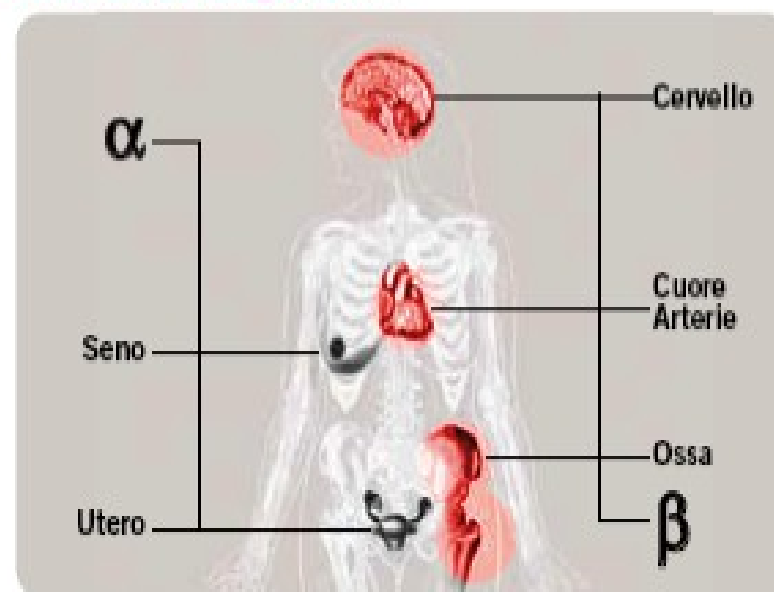
- pro- β -estrogenica (apparato cardiovascolare e struttura ossea)
- anti- α -estrogenica (ghiandola mammaria ed utero)

Terapia Ormonale Sostitutiva (TOS)



Organi attivati ■

Isoflavoni da Trifoglio rosso



■ Organi non attivati

Fitoestrogeni – Osteoporosi

- *Mantenimento del BMD in ratti ovx con efficacia simile a ECE*
(Arjmandi et al, 1998)
- *Genisteina: stimolo su numero e funzione degli osteoblasti, inibizione dell'attività osteoclastica e soppressione del riassorbimento osseo*
(Blair, 1996)
- *In donne in postmenopausa, l'integrazione di 40 g di proteine della soia/dì per 6 mesi ha aumentato il BMD*
(Potter et al, 1998)
- *Assenza di variazioni nei markers del turnover osseo*
con 100-160 mg di isoflavoni/die per 9 mesi (Mackey et al, 1998)

Fitoestrogeni – Prevenzione dell'Osteoporosi

- * Studi osservazionali in donne cinesi in post-menopausa
 - Correlazione positiva tra assunzione alimentare di isoflavoni e Densità Minerale Ossea lombare
 - ↓ Markers riassorbimento osseo
- * Azione protettiva sull'osso simile a quella degli estrogeni
(Interazione con ER β)
- * Dati limitati suggeriscono che l'assunzione protratta di 55-90 mg/die di isoflavoni sia in grado di proteggere l'osso



NOI OCCIDENTALI SIAMO IN GRADO DI CONSUMARE TALI DOSI DI
ISOFLAVONI, PER LUNGHI PERIODI DI TEMPO, CON UN'ALIMENTAZIONE
NATURALE



Gli isoflavoni da Trifoglio rosso sono sicuri e ben tollerati in donne con una storia familiare di cancro al seno

Trevor J Powles, Red clover isoflavones are safe and well tolerated in women with a family history of breast cancer. *Menopause International* 2008; 14: 6-12.

> Obiettivo dello studio:

Verificare la sicurezza e la tollerabilità dell'utilizzo di un integratore a base di isoflavoni da Trifoglio rosso (40 mg) in donne con una storia familiare di cancro al seno e valutare la possibilità di utilizzare questa integrazione per la prevenzione del cancro al seno in donne sane.

> Disegno dello studio:

Donne sane di età compresa tra i 35 e i 70 anni (401 donne) con almeno un caso di tumore al seno a parenti di primo grado, hanno ricevuto isoflavoni da Trifoglio rosso per tre anni in uno studio randomizzato, in doppio cieco contro placebo.

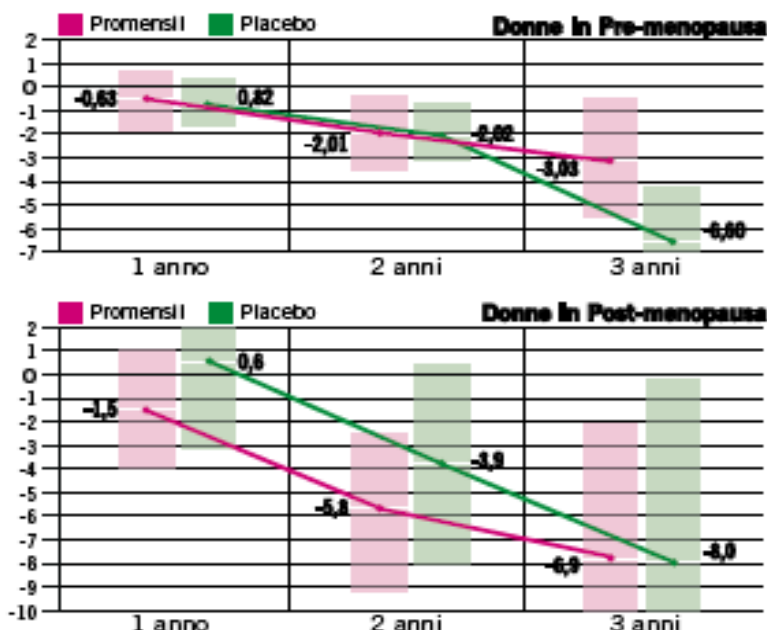
> Risultati:

Nessuna differenza significativa nella densità mammaria, spessore endometriale, livelli di colesterolo, livelli di FSH e densità minerale ossea è stata rilevata tra le donne che assumevano Trifoglio rosso e quelle che assumevano placebo.

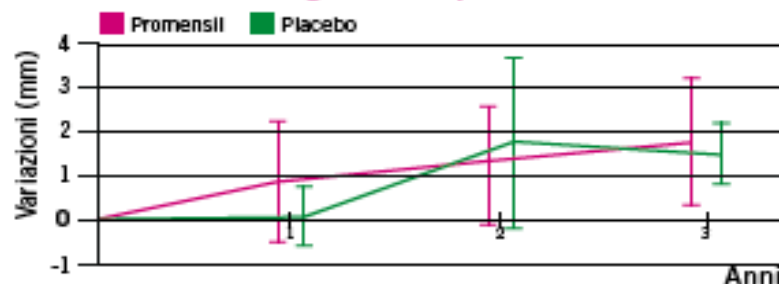
> Conclusioni:

Questo importante studio, della durata di tre anni, supporta l'evidenza che il trattamento con isoflavoni da Trifoglio rosso è sicuro e ben tollerato, anche in donne con storia familiare di cancro al seno. L'integrazione di isoflavoni da Trifoglio rosso non modifica, in alcun modo, la densità mammaria e non ha certamente effetti negativi sullo stato delle ossa e del sistema cardiovascolare, anzi si nota una tendenza ad un miglioramento di entrambi gli elementi. Nelle donne in post-menopausa lo spessore endometriale non è stato in alcun modo modificato dal trattamento con isoflavoni da Trifoglio rosso.

Variazione della densità mammaria durante il trattamento con isoflavoni da Trifoglio rosso o placebo



Variazione dello spessore endometriale durante il trattamento con isoflavoni da Trifoglio rosso o placebo



FITOESTROGENI E TUMORE DELLA MAMMELLA

studi sperimentali: vitro-vivo

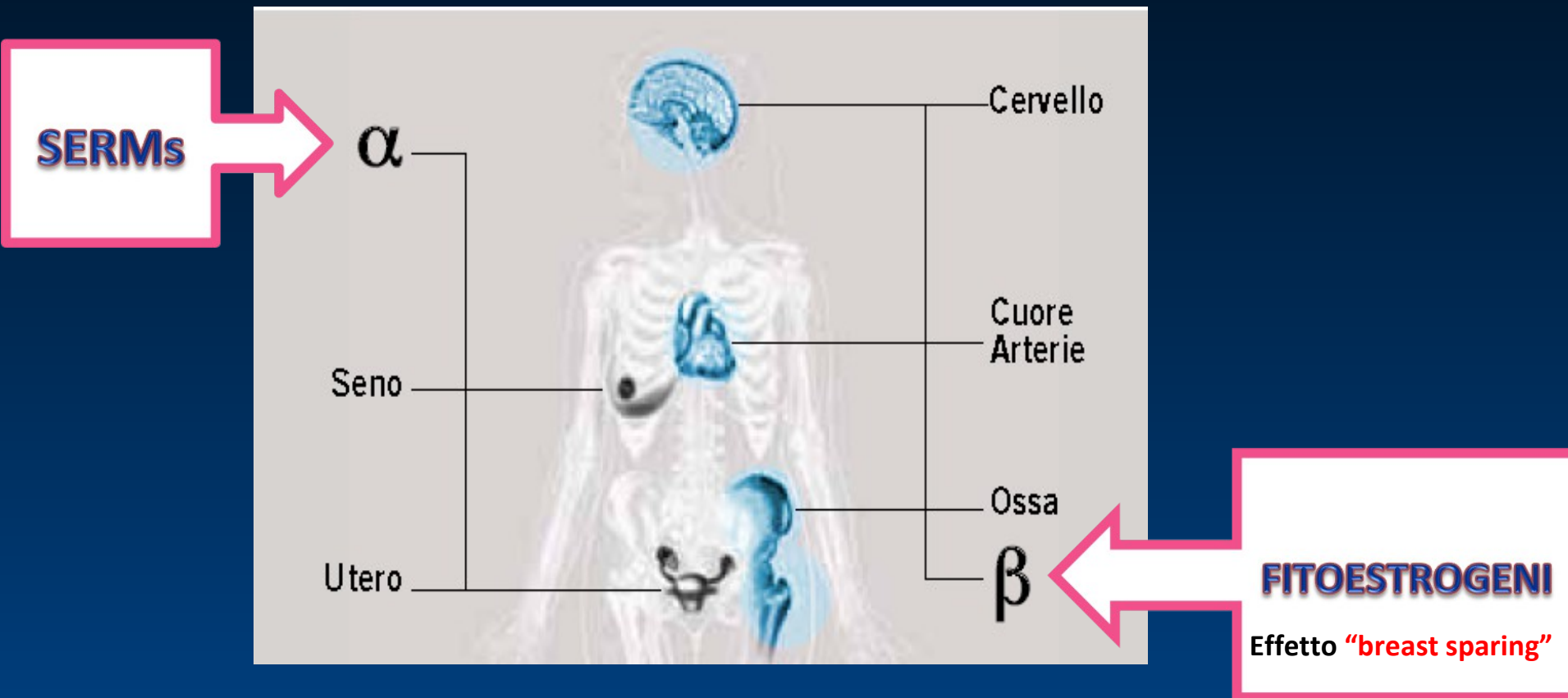
- influenza sulla soppressione indotta da TAM su cellule MCF-7 (Bodinet C. 2002)
- stimolo proliferativo su linee cellulari normali (Schmidt S 2005)
- effetto antiproliferativo bifasico concentrazione-dipendente (MCF-7)(Yap S 2005)
- protettivo antiossidante sui danni ossidativi del DNA (Sierens J 2001)
- nei ratti una dieta povera di isoflavoni annulla l'effetto del TAM (Liu B. 2005)
- alti dosaggi non modificano l'istologia dei dotti mammari (Hows 2004)

studi epidemiologici

protezione  assunzione di isoflavoni fin dall'infanzia (Stephens Y 1997)

FITOESTROGENI

- SERMs di origine naturale
- Esistono diverse sotto-classi: isoflavoni, lignani, cumestani, stilbeni
- Gli isoflavoni possono derivare dalla Soia o dal Trifoglio Rosso



Fitoestrogeni – Tumore della mammella

studi osservazionali-caso/controllo

- Fattore predisponente: obesità
- Fattore protettivo: dieta ricca di fitoestrogeni (isoflavoni)
- Minore incidenza di tumore mammario nelle donne cinesi e giapponesi (1/10)
- Importanza del fattore alimentare (donne orientali in dieta occidentale sviluppano la stessa incidenza di tumore)
- Prognosi migliore per le donne giapponesi rispetto alle donne occidentali
- Maggiore frequenza di forme “in situ” (bassa invasività)
- Minore tendenza alla metastatizzazione
- Influenza/rallentamento sulla progressione tumorale (?)

(Wu et al, 1998)

- Nessuna modificazione della densità mammaria alla mammografia

(Rozenbaum 2007)

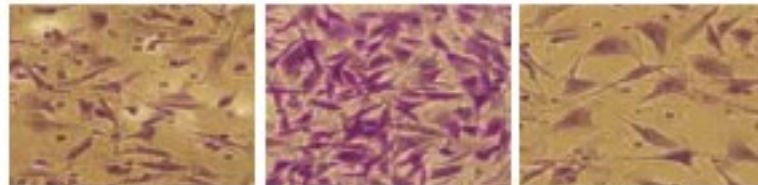
Dagli atti di:

The Breast, *First International Congress on Breast Development Functions and Disease*

Torino, 27-30 Settembre 2007

La somministrazione di una miscela di isoflavoni da Trifoglio rosso è in grado di inibire la migrazione estrogeno-indotta della linea tumorale T47-D. (Fig. 1)

Fig. 1: Le cellule tumorali sono state trattate con estradiolo o estradiolo + mix di fitoestrogeni e valutate per la loro capacità invasiva.



A: controllo

B: estradiolo

C: estradiolo +
mix fitoestrogeni

Questo effetto è dovuto al blocco dell'attivazione, estradiolo-indotta, della moesina. (Fig. 2)

Fig. 2: Mediante esperimenti di Western Blot è stata valutata l'attivazione della moesina (Moesina Fosforilata) dopo differenti trattamenti.



Recenti studi hanno dimostrato che la moesina, proteina coinvolta nella regolazione del citoscheletro cellulare, e quindi importante nella migrazione ed adesione delle cellule tumorali, è over-espressa e attivata nei casi di tumore ad alto potenziale metastatico. Gli ormoni sessuali sembrano avere un ruolo importante nell'indurre questa over-espressione.

> Conclusioni:

Questi nuovi risultati mostrano che l'estratto di Trifoglio rosso può funzionare da antagonista nel pathway di trasduzione, indotto da estradiolo, che altera la capacità delle cellule cancerose di migrare e metastatizzare.

Effects of red clover extracts on breast cancer cell migration and invasion

PAOLO MANNELLA, VERONICA TOSI, ELEONORA RUSSO, SARA ZULLINO, FEDERICA PANCETTI, SANTOSH GOMPAL, KINGA POLAK, ANDREA RICCARDO GENAZZANI, ALESSANDRO D. GENAZZANI, & TOMMASO SIMONCINI

Molecular and Cellular Gynecological Endocrinology Laboratory (MCGEL), Department of Reproductive Medicine and Child Development, University of Pisa, Pisa 56100, Italy

Gynecological Endocrinology, 2011;



Conclusioni: *Il trifoglio rosso inibisce la migrazione e l'invasione delle cellule di una linea tumorale mammaria. Questi dati evidenziano nuovi possibili meccanismi d'azione dei fitoestrogeni sui complessi meccanismi collegati alla crescita e migrazione di cellule tumorali*

Linea cell. T47-D

Progetto Premio

Protocollo Sperimentale

Effetto dell'assunzione orale di trifoglio rosso sui sintomi della sindrome menopausale indotta dal trattamento ormonale adiuvante nelle donne con diagnosi di carcinoma mammario

Progetto Premio

Disegno dello studio

Clinico prospettico randomizzato

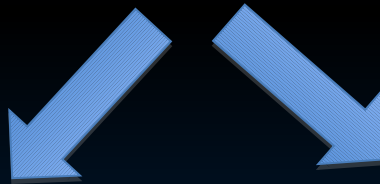
Arruolamento: 80 Pz. / in un anno

*Premenopausa con ca mammario
in terapia ormonale antiestrogenica*

Progetto Premio

R

Doppio cieco



Trifoglio rosso

1 cpr (80 mg)/die
per 24 mesi

Placebo

1 cpr/die
per 24 mesi

Progetto Premio

**Condotta nell' Ambulatorio Progetto PREMIO presso la
Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano.**

Criteri di inclusione:

- **Pazienti con pregresso carcinoma mammario con stadio clinico: T 1/2 ,
N0/1, MO**
- **In terapia con Tamoxifene e/o aLHRH**
- **Con/senza chemioterapia**
- **Carcinoma non insorto in gravidanza**
- **Funzionalità renale, cardiaca, polmonare nella norma**
- **Adesione allo studio con consenso informato**
- **Pazienti in grado di prendere parte allo studio previsto**
- **Score della valutazione MRS (Menopausal Rating Scale) ≥ 8**

PROGETTO PREMIO

Al momento del reclutamento, previa compilazione e firma di un consenso informato, la paziente verrà sottoposta a:

- *visita senologica*
- *visita dietologica*
- *esami ematochimici*
- *MOC vertebrale e femorale*
- *Ecografia pelvica transvaginale*
- *Pap test*
- *Questionario MRS con scala dei valori di effetti collaterali menopausali*
- *Valutazione della densità mammografica*
- *Prelievo del siero per studio in vivo*

PROGETTO PREMIO

Metodi di valutazione

Qualità Vita e Sintomi: Menopause rating scale

*Controlli metabolici: ematochimica, dieta, variazioni ponderali,
attività fisica*

Controlli oncologici: clinici e strumentali a cadenza prestabilita

Progetto Premio

Obiettivi primari

Miglioramento qualità della vita

Non tossicità e non interferenza al trattamento

MENOPAUSE RATING SCALE

Quali dei seguenti sintomi la riguardano attualmente? Per ognuno dei sintomi elencati ne indichi l'eventuale intensità scegliendo l'apposito riquadro. Per i sintomi che non la riguardano segni "assente".

SINTOMI:

	assente, lieve, moderato, grave, molto grave				
					
Punteggio =	0	1	2	3	4
1. Vampate di calore, sudorazione (episodi di sudorazione)	☐	☐	☐	☐	☐
2. Disturbi cardiaci (percezione irregolare del battito cardiaco, tachicardia, senso di costrizione)	☐	☐	☐	☐	☐
3. Disturbi del sonno (difficoltà ad addormentarsi, sonno interrotto,risveglio precoce)	☐	☐	☐	☐	☐
4. Disturbi dell'umore (sensazione di depressione, tristezza, pianto immotivato,apatia e cambiamenti d'umore)	☐	☐	☐	☐	☐
5. Irritabilità (nervosismo,tensione, aggressività)	☐	☐	☐	☐	☐
6. Ansia (agitazione, sensazione di panico)	☐	☐	☐	☐	☐
7. Stanchezza fisica e mentale (calo generale delle prestazioni, compromissione della memoria, calo di concentrazione,smemoratezza)	☐	☐	☐	☐	☐
8. Disturbi sessuali (alterazioni del desiderio, dell'attività sessuale e dell'appagamento)	☐	☐	☐	☐	☐
9. Disturbi dell'apparato urinario (difficoltà nella minzione, aumentato bisogno di urinare, incontinenza urinaria)	☐	☐	☐	☐	☐
10. Secchezza vaginale (sensazione di secchezza o bruciore vaginale, difficoltà durante il rapporto sessuale)	☐	☐	☐	☐	☐
11. Disturbi muscolari e articolari (dolore alle articolazioni, disturbi reumatici)	☐	☐	☐	☐	☐

Progetto Premio

Intervento nutrizionale

*per prevenire o limitare l'incremento ponderale durante il trattamento
e le comorbidità metaboliche-cardiovascolari-osteoarticolari correlate*

PROGETTO PREMIO

INTERVENTO NUTRIZIONALE

- *ANAMNESI MEDICA*
- *ANAMNESI NUTRIZIONALE*
- *STORIA DEL PESO o ANAMNESI ALIMENTARE
(NUTRIZIONALE E COMPORTAMENTALE)*
- *PARAMETRI ANTROPOMETRICI o PESO, ALTEZZA, BMI, CIRC. VITA,
CIRC. FIANCHI*
- *PARAMETRI BIOCHIMICI o PROFILO LIPIDICO,
GLICEMIA, URICEMIA*

PROGETTO PREMIO

INTERVENTO NUTRIZIONALE

CARATTERISTICHE DIETA:

Viene esclusa l'assunzione abituale di alimenti contenenti fitoestrogeni tramite l'anamnesi alimentare

L'intervento è volto al miglioramento complessivo dello stato di salute tramite il progressivo adattamento ai criteri proposti dalla Dieta Mediterranea e dal WCRF (World Cancer Research Foundation)

Avere un BMI compreso tra 18,5 e 25 e ove non sia possibile ottenere un calo ponderale del 10%

Incrementare i livelli di attività fisica (30 min cammino almeno 5 v/sett)

PROGETTO PREMIO

INTERVENTO NUTRIZIONALE

- *Limitare il consumo di alimenti ad alta densità calorica (latticini e dolci)*
- *Incrementare il consumo di cibi di provenienza vegetale, e di cereali poco raffinati (almeno 600 g/die tra verdura e frutta)*
- *Limitare il consumo di carni rosse ed evitare il consumo di carni conservate ed incrementare il consumo di pesce*
- *Limitare il consumo di alcool (120 ml/die) o limitare il consumo di sale (5g/die) o eliminare il fumo*

PROGETTO PREMIO

INTERVENTO NUTRIZIONALE

L'adesione alle norme dietetiche viene monitorata nel tempo tramite un automonitoraggio giornaliero delle frequenze di assunzione degli alimenti

Le pazienti effettueranno le seguenti visite di controllo:

- *durante il 1° anno: 1 visita ogni 3 mesi*
- *durante il 2° anno: 1 visita ogni 6 mesi*

Progetto Premio

Obiettivi secondari

conferma dell'effetto sulla capacità migratoria delle cellule tumorali

Su linee cellulari estrogeno dipendenti e indipendenti MCF7, T47D

Progetto Premio

Test in vitro

*Per il test in vitro si sono utilizzate due linee cellulari mammarie : **MCF7, T47D**
(linee cellulari ormonodipendenti)*

PROGETTO PREMIO

Valutazione in vitro dell'attività estrogenica e dell'induzione di migrazione di linee cellulari mammarie da parte delle pz incluse nello studio

Eseguito pool di siero dalle pz del braccio di controllo e del braccio trattato dopo 3 mesi di trattamento

Valutazione profilo sicurezza: **test in vitro**

1. Test di crescita cellulare
2. Espressione di geni estrogeno-indotti
3. Test di migrazione e invasione

Linee Cellulari

Linee cellulari di adenocarcinoma
mammario ormono-responsive

MCF7

T47D

Campioni Biologici

Pool di sieri

16 donne gruppo *Placebo*

16 donne gruppo *Verum*

4 donne sane in peri-menopuasa

Progetto Premio

Test in vitro

1 Valutazione dell'attività estrogenica

- I test condotti su linee cellulari ormonodipendenti (MCF7,T47D):

Test di proliferazione con siero delle pz in presenza e assenza di 17B estradiolo

Test di modulazione trascrizionale da parte del siero delle pz di geni tipicamente estrogeno-indotti mediante qPCR(PGR, GREB1, TFF1, TGFA, CCND1)

Progetto Premio

Test in vitro

2

Valutazione delle modificazioni dell'attività migratoria di linee cellulari

I test su linee cellulari estrogeno dipendenti ed indipendenti(MCF7,T47D).

-Test di migrazione

-Test di invasione

-Wound healing test

Progetto Premio

Test in vitro

- 1) il siero da utilizzare viene raccolto dopo 3 mesi di trattamento per un livello serico adeguato
(Imhof: potrebbero bastare 4 gg)*
- 2) Il siero prelevato non subisce alcun trattamento*
- 3) 16 campioni da testare per ciascuna linea cellulare
16 Red Clover + 16 Placebo*
- 4) FCS*
- 5) Pool di sieri di donne sane in peri-menopausa*

Progetto Premio

Test in vitro

controllo	estradiolo	tamoxifene	estradi + tamoxi	
5	6	7	8	siero sano
9	10	11	12	siero tamox + placebo
13	14	15	16	siero tamox + red clov

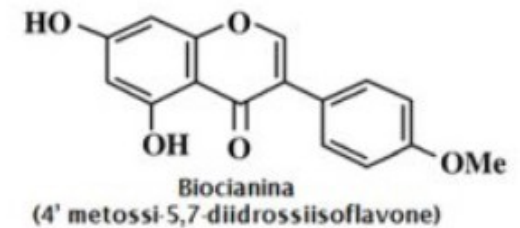
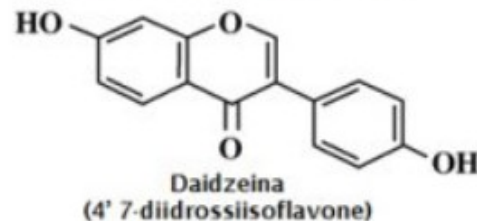
Isoflavoni del Trifoglio Rosso



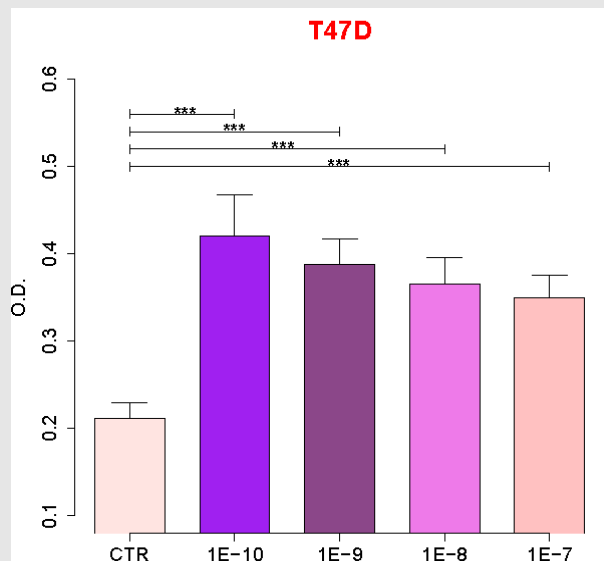
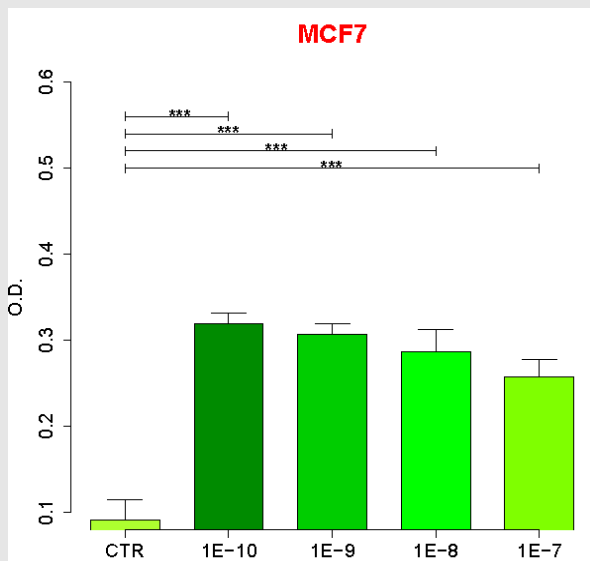
Derivano dalla piante *Trifolium pratense*.

Composto da: Genisteina, Daidzeina,
Bichanina A e Formonectina

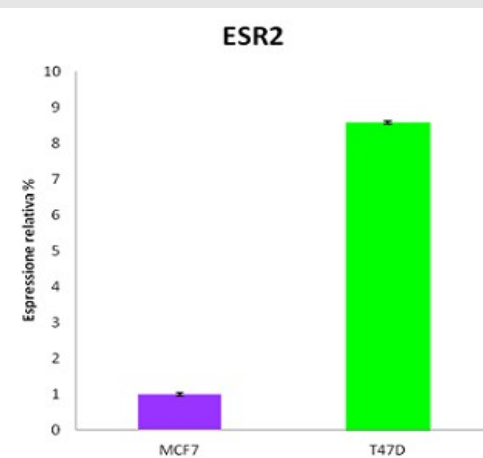
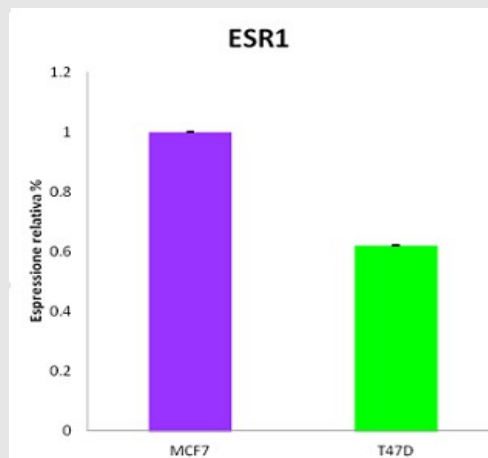
Sono presenti come composti aglicati



CRESCITA IN PRESENZA DI ESTRADIOLO



ESPRESSIONE GENICA DI ESR1 E ESR2



0.001 < p.Value < 0.01 *

0.000 < p.Value < 0.001 **

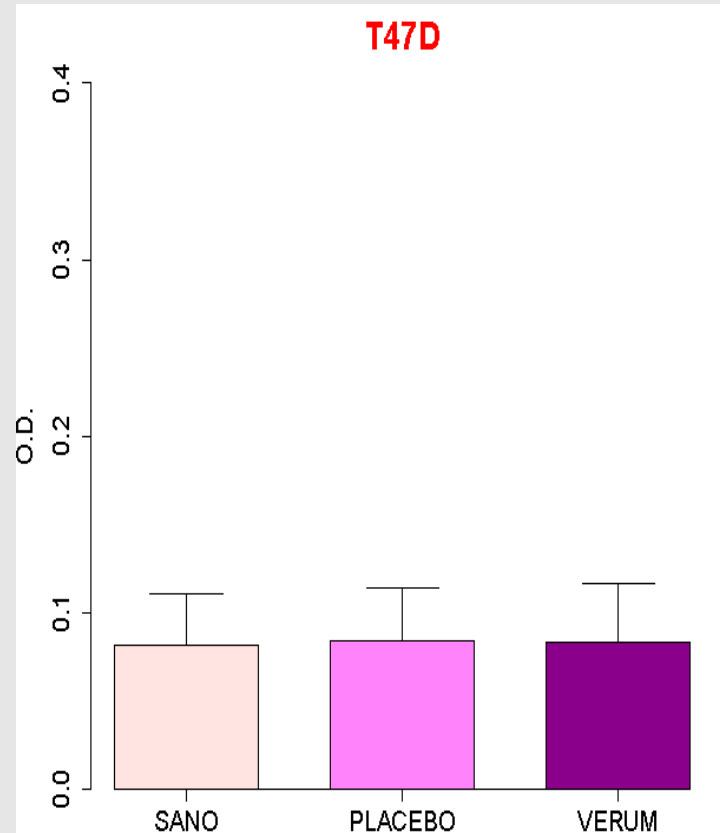
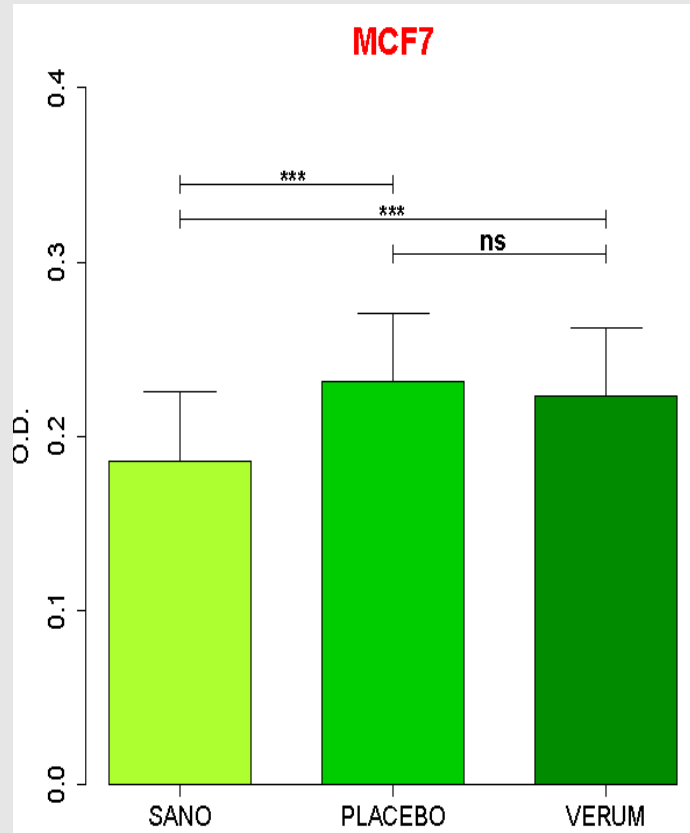
p.Value < 0.0001 ***

0.001 < p.Value < 0.01 *

0.000 < p.Value < 0.001 **

p.Value < 0.0001 ***

SAGGI DI CRESCITA IN PRESENZA DEI DIVERSI POOL DI SIERI

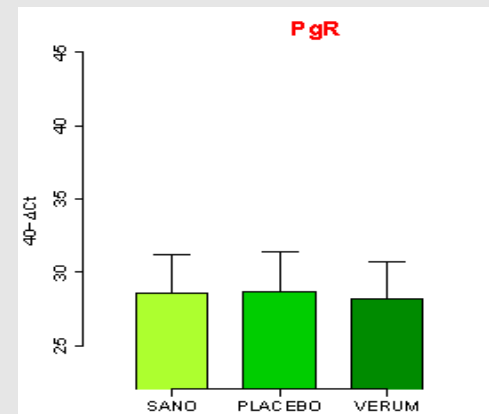
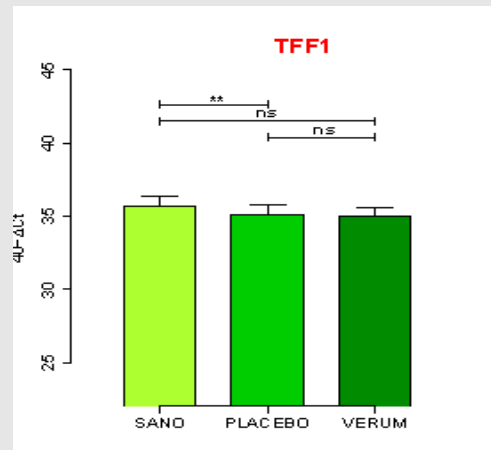
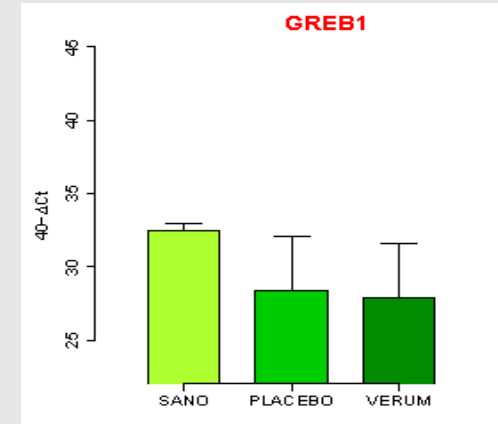
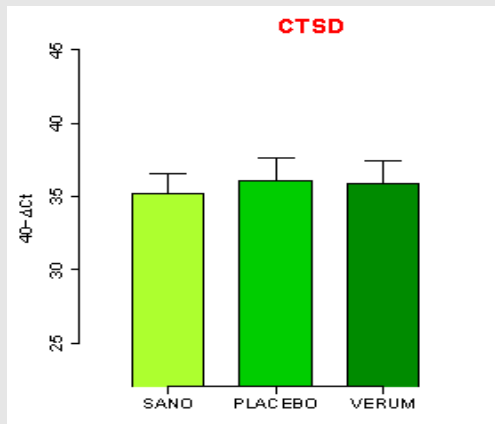
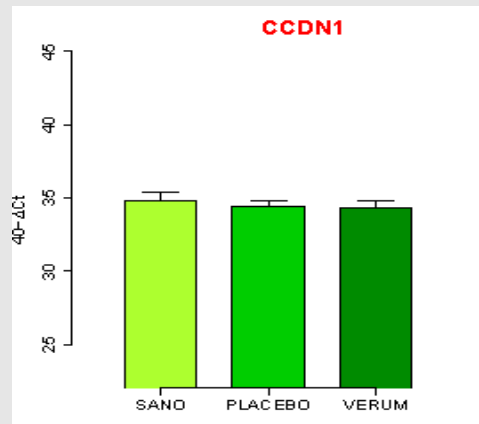


$0.001 < p.\text{Value} < 0.01$ *

$0.000 < p.\text{Value} < 0.001$ **

$p.\text{Value} < 0.0001$ ***

MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI GENI ESTROGENO-INDOTTI: MCF-7

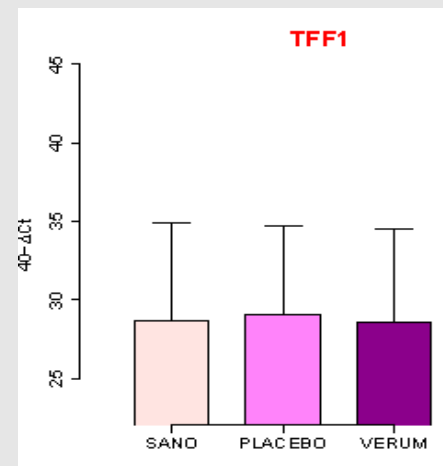
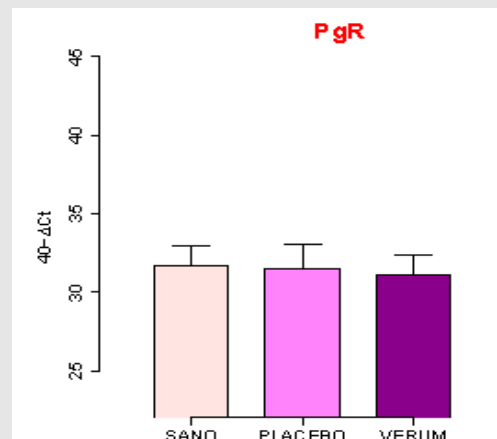
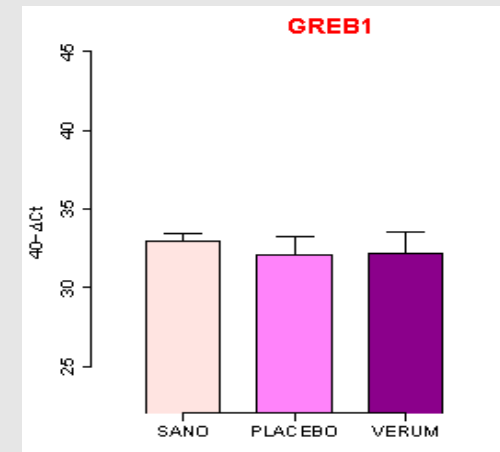
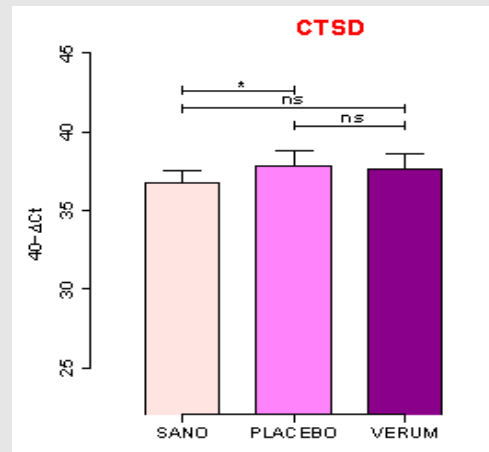
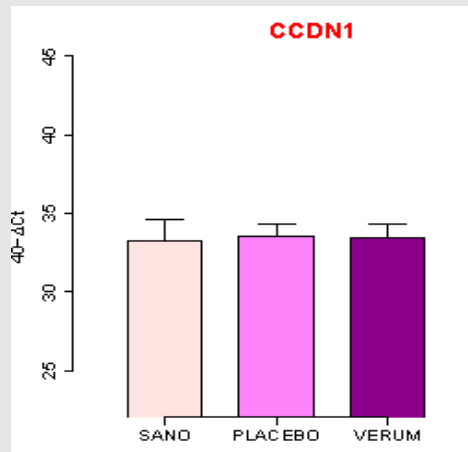


0.001 < p.Value < 0.01 *

0.000 < p.Value < 0.001 **

p.Value < 0.0001 ***

MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI GENI ESTROGENO-INDOTTI: T47D



0.001 < p.Value < 0.01 *
0.000 < p.Value < 0.001 **
p.Value < 0.0001 ***

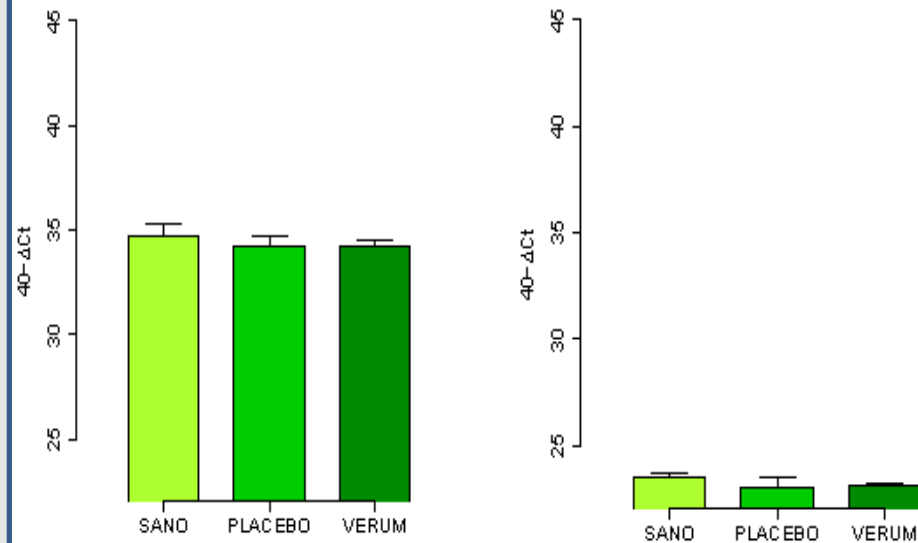
Progetto Premio

ESPRESSIONE DEI GENI CODIFICANTI PER ESR1 ED ESR2 NELLE MCF7 E T47D

MCF7

ESR1

ESR2

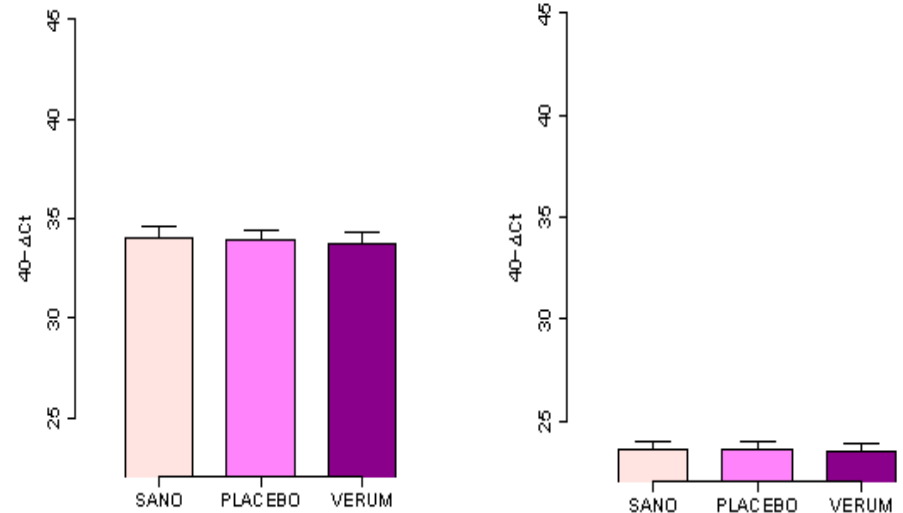


$0.001 < p.\text{Value} < 0.01$ *
 $0.000 < p.\text{Value} < 0.001$ **
 $p.\text{Value} < 0.0001$ ***

T47D

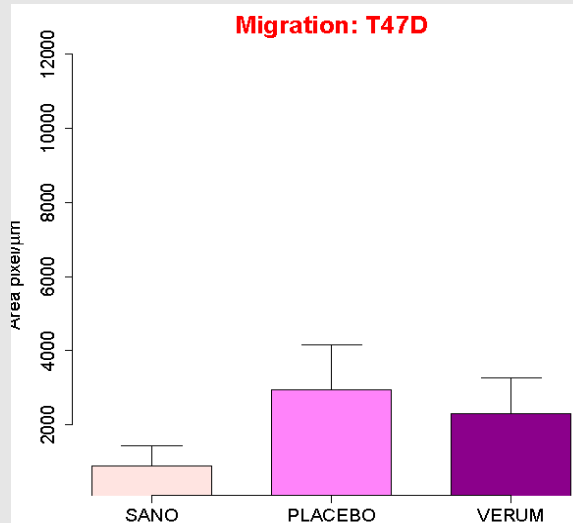
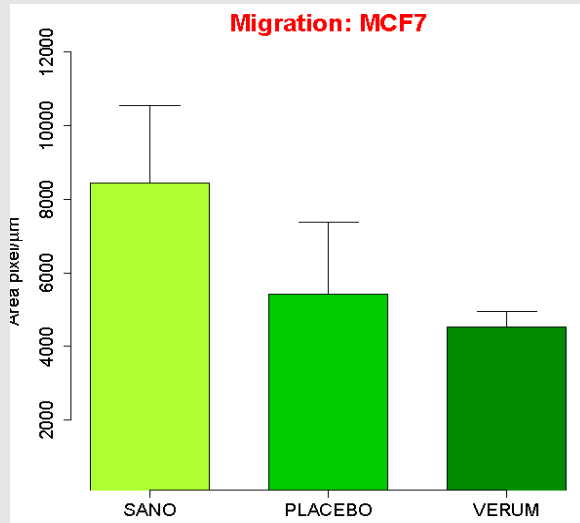
ESR1

ESR2

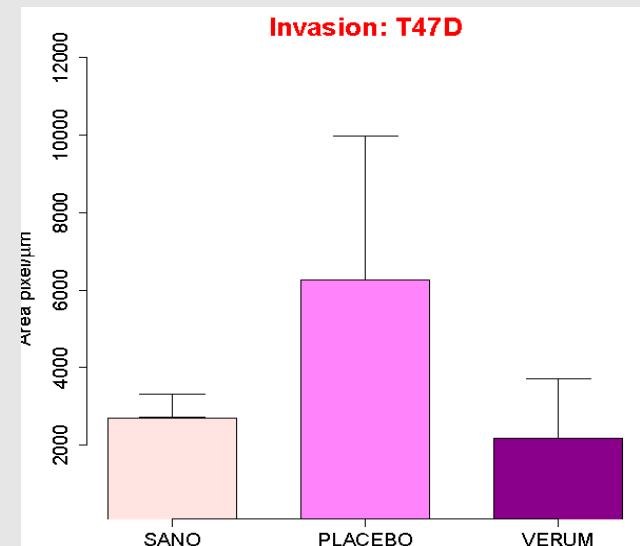
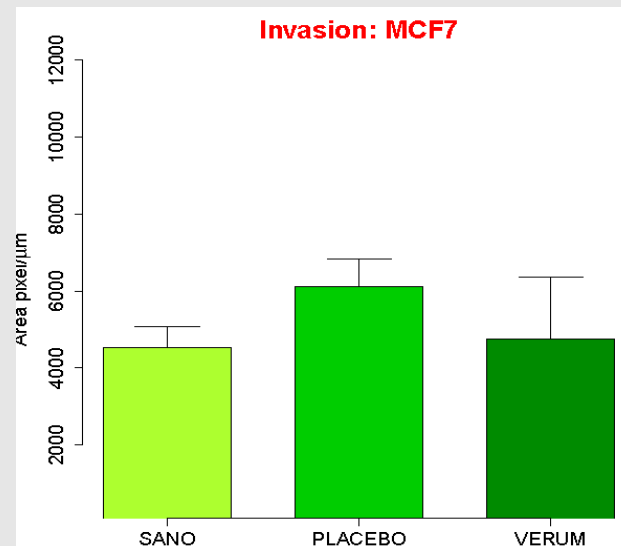


SAGGI DI MIGRAZIONE NELLE MCF-7 E T47D

Progetto Premio



SAGGI DI INVASIONE NELLE MCF-7 E T47D



0.001 < p.Value < 0.01 *

0.000 < p.Value < 0.001 **

p.Value < 0.0001 ***

Grazie

Grazie

Grazie

Grazie

Grazie



FLOW-CHART DELLO STUDIO



OBIETTIVI PRIMARI

miglioramento della qualità di vita

riduzione dei sintomi della Sindrome menopausale indotta dal trattamento antineoplastico

OBIETTIVI SECONDARI

profilo di sicurezza del trattamento con *Trifoglio rosso* rispetto a *Placebo* in termini di:

- interferenza con il trattamento ormonale
- attività estrogenica su cellule di carcinoma mammario