

# EFFETTI DI INQUINANTI AMBIENTALI SULLA SECREZIONE DEL GH E SULLA VIA DEL RECETTORE ARILICO DEGLI IDROCARBURI IN CELLULE DI ADENOMA IPOFISARIO DI RATTO GH-SECERNENTI

Valentina Zunino<sup>1</sup>, Maria Graziella Catalano<sup>1</sup>, Federica Guaraldi<sup>2</sup>, Valentina D'Angelo<sup>2</sup>, Federica Penner<sup>3</sup>, Francesco Zenga<sup>3</sup>, Francesca Pecori Giraldi<sup>4</sup>, Emanuela Arvat<sup>1,2</sup>, Nicoletta Fortunati<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, Torino, Italia

<sup>2</sup>SC Endocrinologia Oncologica DU, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino, Italia

<sup>3</sup>SC Neurochirurgia DU, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

<sup>4</sup>Istituto Auxologico Italiano IRCCS, Cusano Milanino (MI), Italia, e Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università di Milano, Milano, Italia

## Introduzione

Gli adenomi ipofisari rappresentano circa il 10-25% dei tumori intracranici (1). Tra questi, gli adenomi GH-secernenti (somatotropi), che si manifestano clinicamente con i segni e sintomi dell'acromegalia, si pongono per frequenza al terzo posto, dopo i prolattinomi e gli adenomi non secernenti. Benché si tratti di patologie rare, la loro prevalenza è recentemente incrementata (2). Alcuni studi epidemiologici hanno messo in relazione acromegalia e inquinamento ambientale; tra questi, il lavoro di Pesatori et al. (2008) in cui si osserva un incremento dell'incidenza dei tumori ipofisari in aree interessate da un'alta concentrazione di diossina (5) e il più recente studio condotto da Cannavò et al. (2010) che ha dimostrato un significativo incremento dei casi di acromegalia nelle aree più inquinate nella zona di Messina (6). Infine, recentemente, Tapella et al. (2016) hanno dimostrato che benzene e di-2-etilstilftalato alterano la proliferazione di cellule ipofisarie di ratto in vitro (7). In generale, gli inquinanti ambientali attivano la via di segnalazione mediata da AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) e AIP (AhR Interacting Protein), e, attraverso questa, possono esercitare i loro effetti a livello cellulare. Inoltre, molti composti identificati come inquinanti ambientali, sono stati anche classificati quali *endocrine disruptors*, per la loro capacità di interferire con il fisiologico funzionamento del sistema endocrino. Di particolare interesse per i potenziali effetti cancerogeni e a livello endocrino sono il benzene (BZ), diffuso in tutto il mondo (3) e presente nel fumo di tabacco, nei gas esausti dei veicoli a motore e nelle emissioni industriali; il di-2-etilstilftalato (DEHP), comunemente utilizzato nell'industria delle materie plastiche, riscontrato in diversi compartimenti ambientali (4); i policlorobifenili (PCB), inquinanti organici banditi oggi in molti paesi, ma purtroppo a lungo persistenti nei sistemi ambientali. A oggi non ci sono studi riguardanti l'influenza di questi inquinanti ambientali sul comportamento dei tumori ipofisari in termini di conferimento di aggressività funzionale. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare in vitro gli effetti di BZ, DEHP e PCB in cellule GH3 di ratto, sulla produzione di GH e sull'espressione di molecole coinvolte nel pathway di AhR.

## Materiali e metodi

Come modello in vitro sono state utilizzate cellule di adenoma ipofisario di ratto GH secernenti (GH3), trattate con 130 pM BZ, 250 pM DEHP, and 100 ng/l PCB a diversi tempi. Al termine sono stati valutati: 1) *Espressione genica* di GH, AIP, AhR e CYP1A1 (Citocromo p450 1A1, gene target di attivazione di AhR), ER $\alpha$  (recettore  $\alpha$  per gli estrogeni), PR (recettore per il progesterone) e FOXA1 (Forkhead box protein A1) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento, mediante PCR Real Time; 2) *Espressione proteica di GH* valutata con Western blot, dopo estrazione proteica delle cellule trattate per 72 ore con i tre inquinanti; 3) *Secrezione di GH*: il livello di GH secreto nel medium di cellule trattate per 72 ore con i tre inquinanti è stato misurato con uno specifico ELISA per GH di ratto (Rat Growth Hormone ELISA Assay, Invitrogen Ltd, Paisley, UK).

## Risultati

Il BZ incrementa l'espressione genica del GH dopo 72 ore di trattamento (Fig1A); abbiamo inoltre potuto osservare anche un significativo aumento della proteina con il western blot (Fig1B e 1C), e della secrezione della stessa nel medium di coltura (BZ= 440  $\pm$  75 ng/ml; Controllo= 271  $\pm$  17ng/ml, p<0.01). DEHP e PCB aumentano il livello proteico di GH (Fig1E, 1F, 1H e 1I) e la sua secrezione nel medium (DEHP= 410  $\pm$  6ng/ml, PCB= 513  $\pm$  11 ng/ml, rispettivamente p<0.05 e p<0.01 vs controllo), senza modificare l'espressione genica (Fig1D e 1G). Nessuno dei

pollutanti modifica l'espressione genica di AIP (Fig2A, 2D e 2G) e AhR (Fig2B, 2E e 2H). CYP1A1 invece è indotto già dopo 24 ore di trattamento con BZ (Fig2C) e più tardivamente (72h) da DEHP (Fig2F) e PCB (Fig2I). Un significativo aumento dell'espressione di *ER*1 $\alpha$  si osserva dopo 48 e 72h di trattamento con DEHP (Fig3D) e dopo 48h con PCB (Fig3G), mentre non viene influenzata da BZ (Fig3A). PR è modificato solo da BZ dopo 72h (Fig3B), FOXA1 aumenta dopo 24h di trattamento con BZ (Fig3C), 24 e 48 con DEHP (Fig3F) e 48 con PCB (Fig3I).

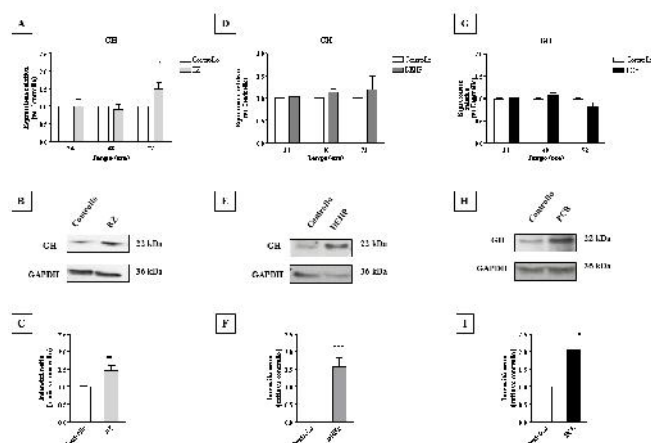
## Discussione

I nostri risultati indicano che BZ, DEHP e PCB hanno un importante effetto nell'incrementare la produzione e secrezione di GH da parte delle cellule di adenoma ipofisario di ratto, suggerendo che questi inquinanti ambientali possano essere coinvolti nel conferire una maggiore aggressività biologico-funzionale agli adenomi GH-secerenti. Inoltre, poiché tutti e tre i inquinanti aumentano i livelli di espressione di CYP1A1, gene target di AhR, coinvolto anche nei processi di cancerogenesi, i nostri dati suggeriscono un'attivazione della via di segnalazione di AhR da parte dei inquinanti studiati. Infine, dato che l'espressione dei geni CYP è strettamente legata al pathway estrogenico, l'effetto esercitato su FOXA1 dai tre inquinanti, l'induzione di PR da parte del BZ e di ER $\alpha$  da parte di DEHP e PCB, suggeriscono un possibile coinvolgimento della via estrogenica.

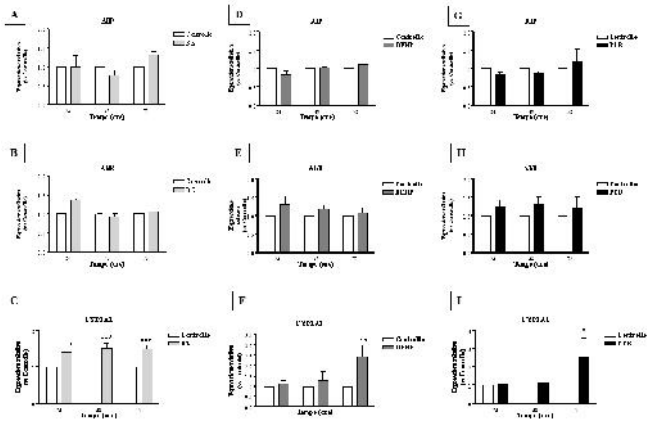
Pertanto, il presente studio dimostra per la prima volta che BZ, DEHP e PCB, inquinanti ampiamente diffusi, possono modificare il comportamento e le caratteristiche delle cellule GH3, incrementando la produzione di GH, attivando il pathway regolato da AhR e interferendo con la via di segnalazione estrogenica.

## Bibliografia

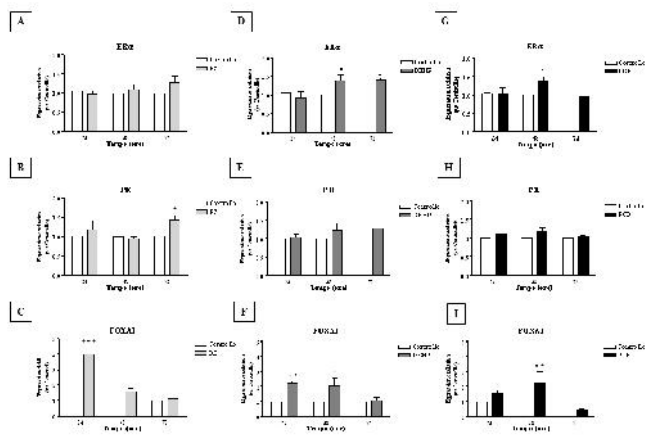
1. Dworakowska D, Grossman AB, 2009. The pathophysiology of pituitary adenomas. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 23, 525-541.
2. Beckers A, 2010. Higher prevalence of clinically relevant pituitary adenomas confirmed. *Clin. Endocrinol.* 72, 290-291.
3. WHO Expert Consultation: Available evidence for the future update of the WHO Global Air Quality Guidelines (AQGs), 2015: Meeting Report Bonn Germany
4. Magdoulis S, Dagher R, Brar SK, Drogi P, Tyagi RD, 2013. Di 2-ethylhexylphthalate in the aquatic and terrestrial environment: A critical review. *J. Environ. Manage.* 127, 36-49.
5. Pesatori AC, Baccarelli A, Consonni D, Lania A, Beck-Peccoz P, Bertazzi PA, Spada A, 2008. Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein and pituitary adenomas: a population-based study on subjects exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident. *Eur. J. Endocrinol.* 159, 699-703.
6. Cannavò S, Ferrà F, Ragonese M, Curtò L, Torre ML, Magistri M, Marchese A, Alibrandi A, Trimarchi F, 2010. Increased prevalence of acromegaly in highly polluted area. *Eur. J. Endocrinol.* 163, 509-513.
7. Tapella L, Sesta A, Cassarino MF, Zunino V, Catalano MG, Pecori Giraldo F, 2016. Benzene and 2-ethylphthalate induce proliferation in normal rat pituitary cells. *Pituitary*. [Epub ahead of print]



**Figura 1. Effetto di BZ, DEHP e PCB sull'espressione e secrezione di GH.** Espressione genica di *GH* dopo trattamento con 130 pM BZ (A), 250 pM DEHP (D) e 100 ng/l PCB (G) per 24, 48, 72 ore. Western blot per GH (B, E, H); l'immagine mostra un esperimento tipico. Analisi semiquantitativa (C, F, I) dei risultati del western blot (N=3). Significatività vs controllo: \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.



**Figura 2. Effetto di BZ, DEHP e PCB sull'espressione genica di AIP, AhR e CYP1A1.** Espressione genica di AIP (A, D, G), AhR (B, E, H) e CYP1A1 (C, F, I) dopo trattamento con 130 pM BZ, 250 pM DEHP e 100 ng/l PCB per 24, 48 e 72 ore. Significatività vs controllo: \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.



**Figura 3. Effetto di BZ, DEHP e PCB sull'espressione genica di ER, PR e FOXA1.** Espressione genica di ER (A, D, G), PR (B, E, H) e FOXA1 (C, F, I) dopo trattamento con 130 pM BZ, 250 pM DEHP, and 100 ng/l PCB per 24, 48 e 72 ore. Significatività vs controllo: \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

(Grant PRIN, AA 2010-2011 cod-DI1112000360001).



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO



CNBSV

sie  
Società Italiana  
Endocrinologia

I° meeting  
Club SIE Endocrinologia Ambientale  
Roma, 19 giugno 2017

Sala Polifunzionale PCM  
Via Santa Maria in via 39



## EFFETTI DI INQUINANTI AMBIENTALI SULLA SECREZIONE DEL GH E SULLA VIA DEL RECEPTORE ARI LICO DEGLI IDROCARBURI IN CELLULE DI ADENOMA IPOFISARIO DI RATTO GH-SECERNENTI

**Valentina Zunino<sup>1</sup>, Maria Graziella Catalano<sup>1</sup>, Federica Guaraldi<sup>2</sup>, Valentina D'Angelo<sup>2</sup>, Federica Penner<sup>3</sup>, Francesco Zenga<sup>3</sup>, Francesca Pecori Giraldi<sup>4</sup>, Emanuela Arvat<sup>1,2</sup>, Nicoletta Fortunati<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, Torino, Italia

<sup>2</sup> SC Endocrinologia Oncologica DU, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino, Italia

<sup>3</sup> SC Neurochirurgia DU, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino

<sup>4</sup> Istituto Auxologico Italiano IRCCS, Cusano Milanino (MI), Italia, e Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università di Milano, Milano, Italia

## Gli adenomi ipofisari

- ✓ Gli adenomi ipofisari sono le neoplasie benigne più frequenti a carico del sistema nervoso centrale
- ✓ Sono considerati tumori rari, ma il loro numero è in aumento
- ✓ Adenomi GH-secernenti → Terzo tipo più comune di adenoma ipofisario  
→ Segni e sintomi di ACROMEGALIA
- ✓ Maggior prevalenza di acromegalia in aree ad alto tasso di inquinamento

**I fattori ambientali** giocano un ruolo chiave?



# Inquinanti ambientali e adenomi ipofisari

European Journal of Endocrinology (2010) 163 509–513

ISSN 0804-4643

CLINICAL STUDY

## Increased prevalence of acromegaly in a highly polluted area

S Cannavò<sup>1,\*</sup>, F Ferrau<sup>1,\*</sup>, M Ragonese<sup>1</sup>, L Curtò<sup>1</sup>, M L Torre<sup>1</sup>, M Magistri<sup>2</sup>, A Marchese<sup>3</sup>, A Alibrandi<sup>4</sup> and F Trimarchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Section of Endocrinology, Department of Medicine and Pharmacology, University of Messina, Messina 98125, Italy, <sup>2</sup>Healthcare Agency of the Province of Messina (ASP), <sup>3</sup>Regional Agency for Environmental Protection (ARPA) and <sup>4</sup>Department of Statistical Science, University of Messina, Messina 98100, Italy

European Journal of Endocrinology (2008) 159 699–703

ISSN 0804-4643

CLINICAL STUDY

## Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein and pituitary adenomas: a population-based study on subjects exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident

Angela Cecilia Pesatori<sup>1,2</sup>, Andrea Baccarelli<sup>2,3</sup>, Dario Consonni<sup>2</sup>, Andrea Lania<sup>4</sup>, Paolo Beck-Peccoz<sup>4</sup>, Pier Alberto Bertazzi<sup>1,2</sup> and Anna Spada<sup>4</sup>

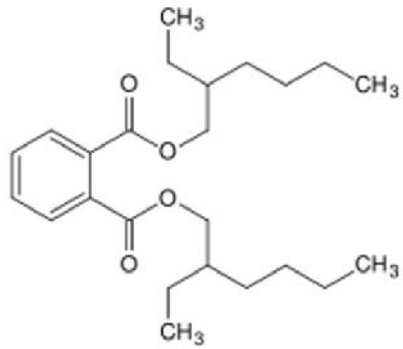
<sup>1</sup>Department of Occupational and Environmental Health, EPOCA Research Center, Clinica 'L. Dewoto', University of Milan, Via San Barnaba 8, 20122 Milano, Italy, <sup>2</sup>Epidemiology Unit, Department of Preventive Medicine, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milan, Italy, <sup>3</sup>Department of Occupational and Environmental Health, Center of Molecular and Genetic Epidemiology, University of Milan, Milan, Italy and <sup>4</sup>Endocrine Unit, Department of Medical Sciences, Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, University of Milan, Milan, Italy

(Correspondence should be addressed to A C Pesatori; Email: angela.pesatori@unimi.it)

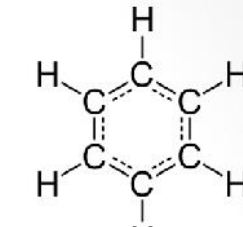
# Inquinanti ambientali e sistema endocrino

- ✓ È noto che fattori ambientali ed in particolare gli inquinanti a cui siamo quotidianamente esposti possano essere coinvolti nell'insorgenza di molte patologie
- ✓ Alcune sostanze chimiche presenti nell'ambiente sono in grado di interferire con il funzionamento del sistema endocrino
- ✓ Sono state identificate diverse classi di sostanze implicate nel sovvertimento del sistema endocrino, tra cui: ftalati, alchilfenoli, bifenilipoliclorurati, pesticidi organoclorurati, ritardanti di fiamma bromati

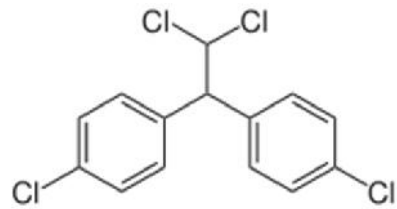




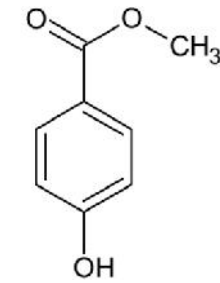
**Di-2-etilesifalato**



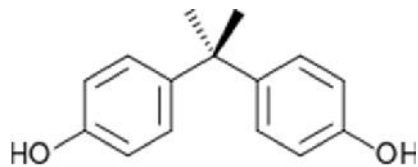
**Benzene**



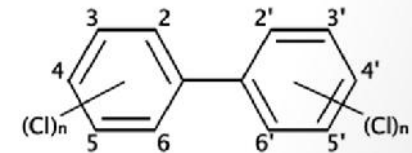
**1,1-dicloro.2,2-bis(p-clorofenil)etano**



**Metilparabene**



**Bisfenolo A**



**Policlorobifenili**



# Scopo del lavoro

Valutazione in vitro dell'effetto di alcuni diffusi inquinanti

Effetti sul GH:

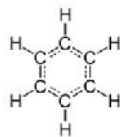
- Espressione genica
- Proteica
- Secrezione

Molecole coinvolte nel pathway di AhR

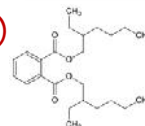
Molecole coinvolte nel pathway estrogenico



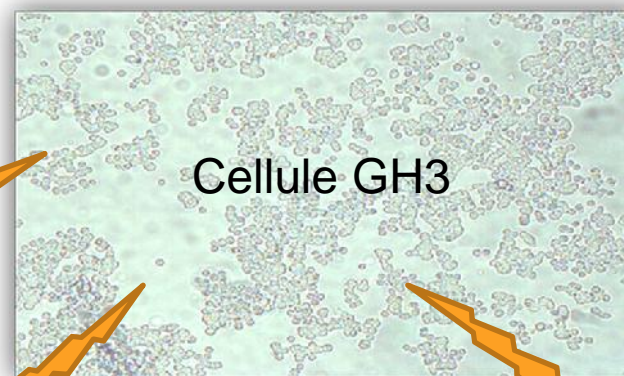
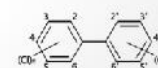
Benzene (BZ)



Di-2-etiesilftalato (DEHP)

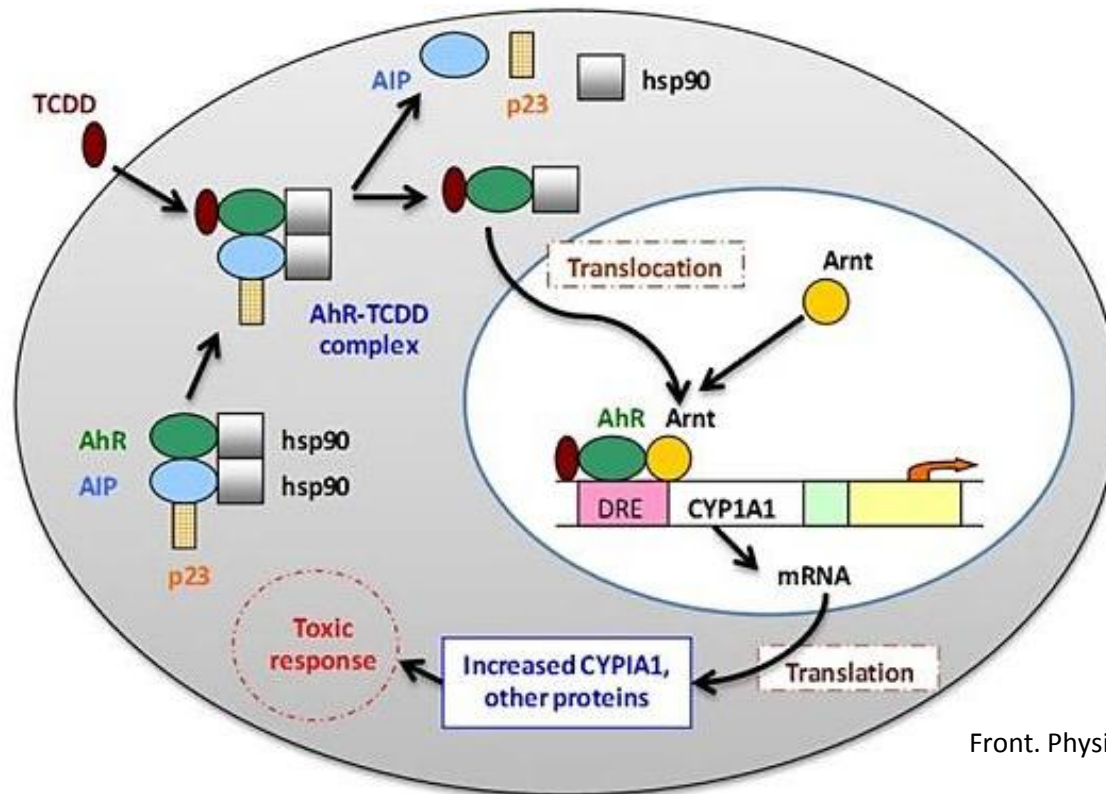


Policlorobifenili (PCB)



Cellule GH3

# Il pathway di AhR



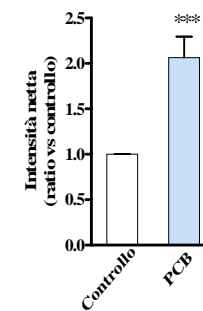
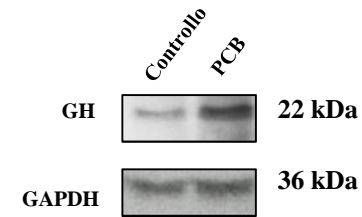
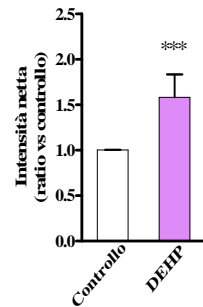
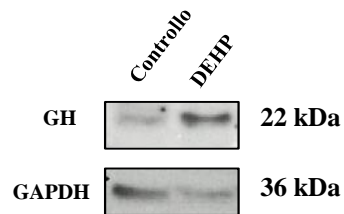
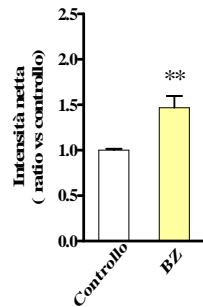
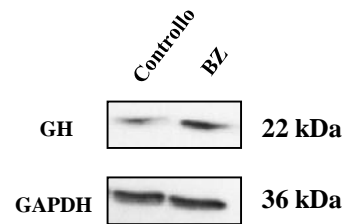
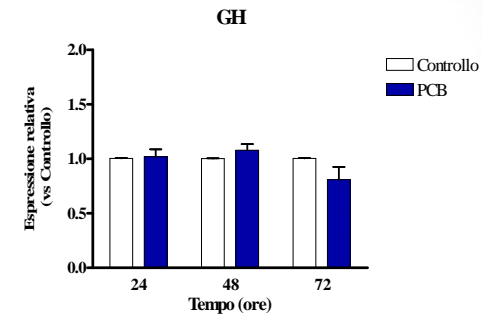
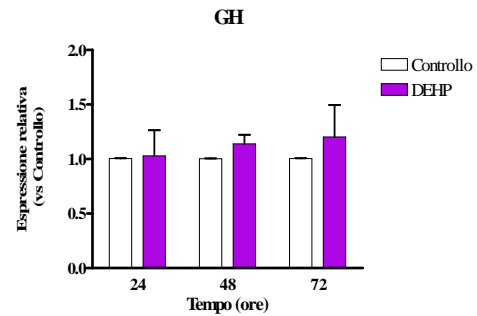
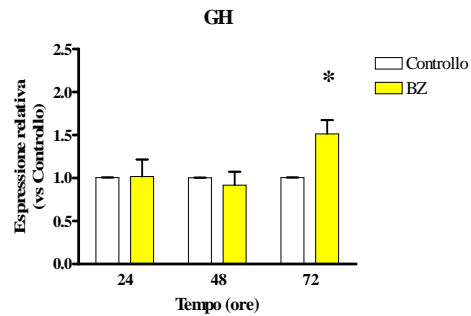
Front. Physiol., 14 December 2012

AhR (Recettore per gli idrocarburi arilici)

AIP (AhR Interacting Protein) Stabilizza AhR a livello citoplasmatico

CYP1A1 (Citocromo p450 1 A1) Coinvolto nel metabolismo di xenobiotici e farmaci, ma associato anche a processi di carcinogenesi

# Effetto sul GH

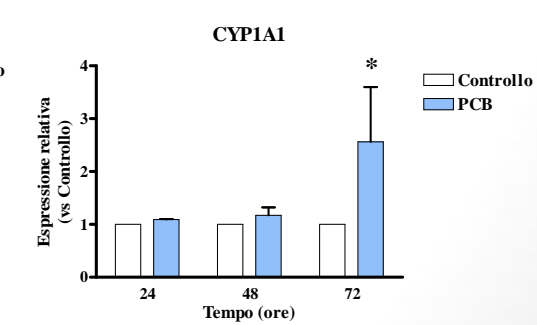
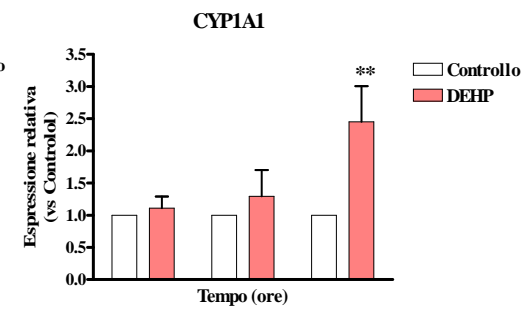
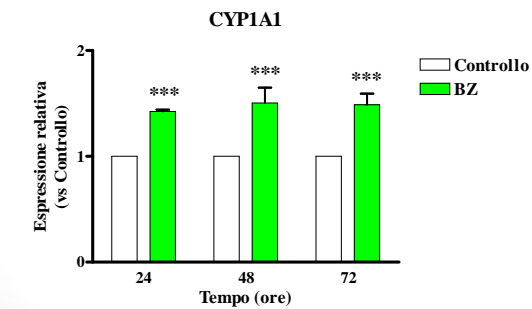
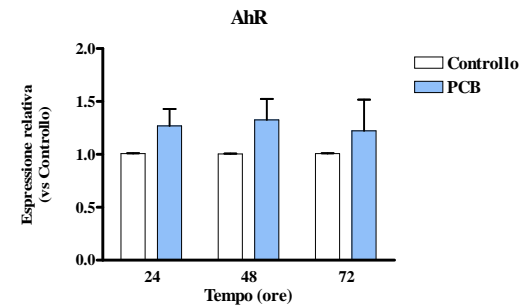
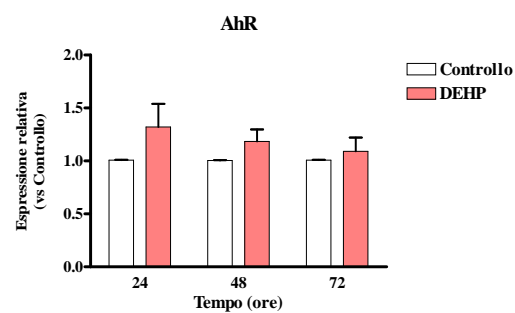
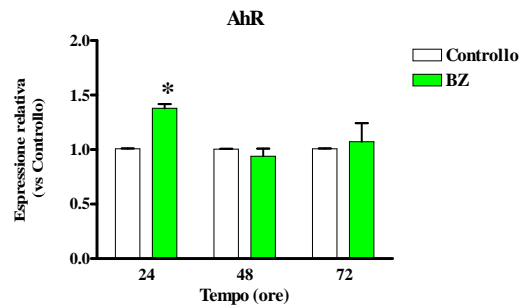
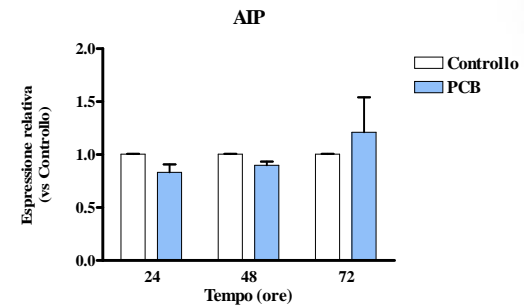
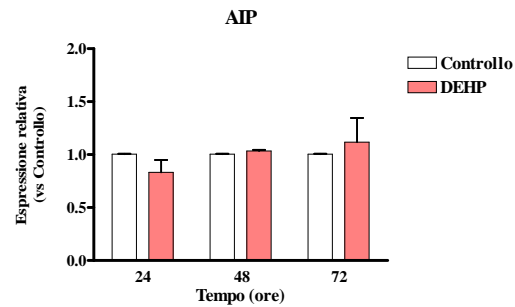
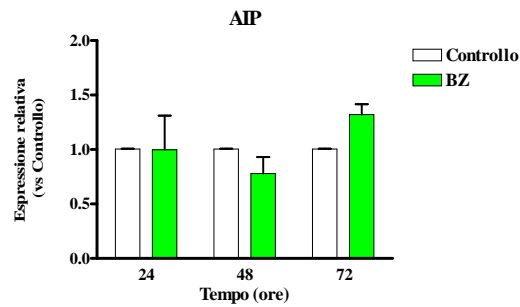


Secrezione nel medium dopo 72h di trattamento

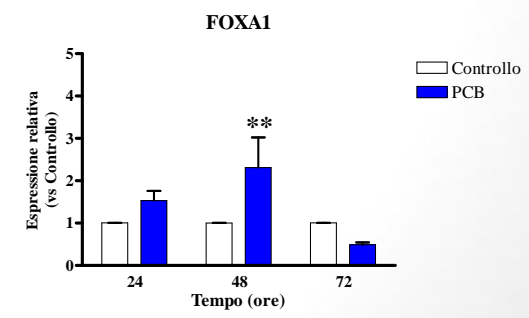
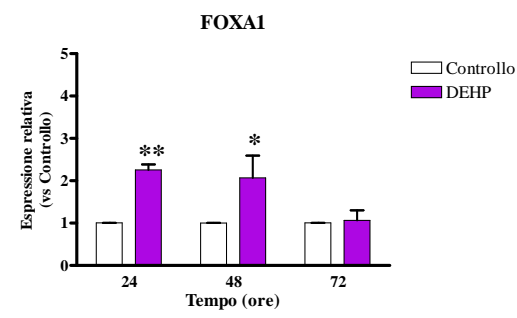
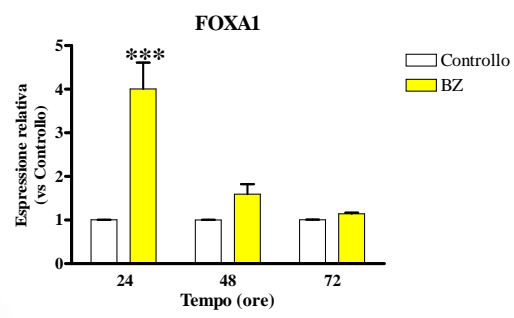
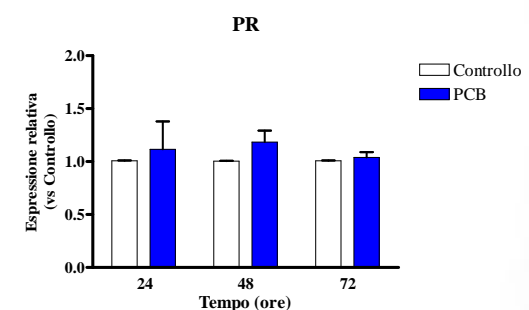
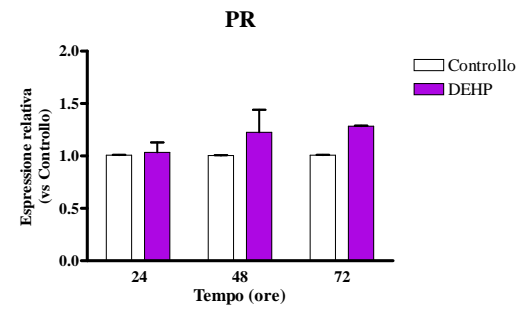
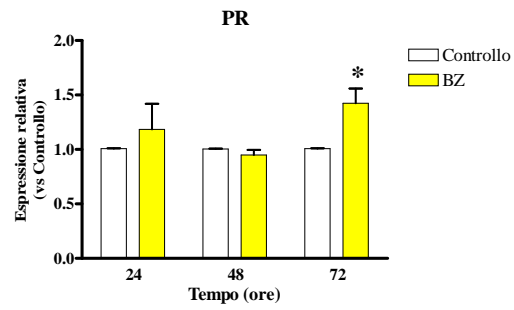
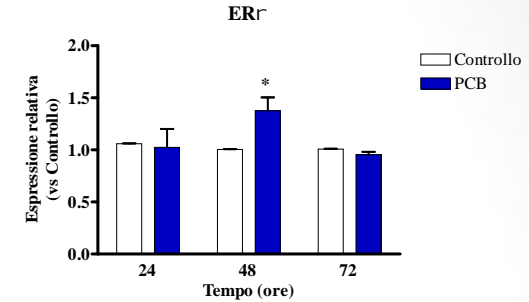
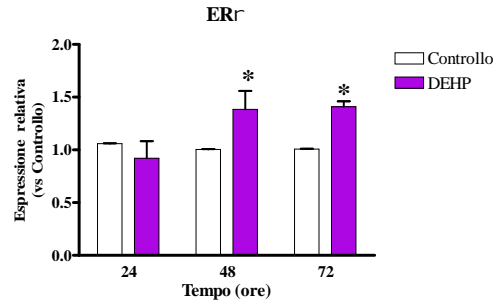
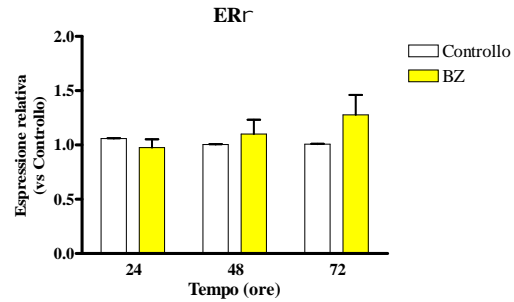
	Controllo	BZ	DEHP	PCB
GH (ng/ml)	271 ± 17	440 ± 75 (**)	410 ± 6 (*)	513 ± 11 (**)



# Effetto su AIP, AhR e CYP1A1



# Effetto sul pathway estrogenico



# Conclusioni

- I nostri dati indicano che le sostanze chimiche da noi testate determinano un effetto importante sul comportamento delle cellule GH3
- BZ, DEHP e PCB modificano la produzione di GH
- Produzione proteica e secrezione nel medium
- In termini di espressione genica (BZ)
- Incremento espressione genica di CYP1A1 → Attivazione pathway di AhR
- Induzione espressione di FOXA1, ER e PR → Modulazione via estrogenica

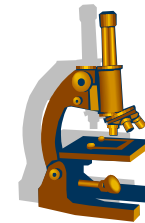
# Conclusioni

Complessivamente...

- ✓ BZ, DEHP e PCB possono modificare la biologia di cellule ipofisarie GH secernenti conferendo loro maggiore aggressività funzionale e attivando vie di segnalazione coinvolte nei processi di carcinogenesi

Lavori in corso...

- ✓ Valutazione degli effetti su colture primarie umane
- ✓ Valutazione approfondita dei pathway molecolari influenzati dall'esposizioni agli inquinanti ambientali



# Laboratorio di Endocrinologia Oncologica



Dipartimento Scienze Mediche, Università di Torino

SC Endocrinologia Oncologica DU, AOU Città della Salute e della  
Scienza di Torino

Grazie per l'attenzione

