

Nonilfenolo e adenocarcinoma dell'endometrio: effetti su colture *in vitro* a differenti concentrazioni

V. FREGA¹, E. TRABUCCO¹, M.A. CASTALDI¹, O. BOCCIA¹, L. MOSCA¹, G. FATIGATI¹, N. COLACURCI¹, A. DE LUCA², L. COBELLIS¹

RIASSUNTO: Nonilfenolo e adenocarcinoma dell'endometrio: effetti su colture *in vitro* a differenti concentrazioni.

V. FREGA, E. TRABUCCO, M.A. CASTALDI, O. BOCCIA, L. MOSCA, G. FATIGATI, N. COLACURCI, A. DE LUCA, L. COBELLIS

Obiettivi. Il nonilfenolo (NP) è un inquinante ubiquitario sia dell'ambiente acquatico che di quello terrestre. Tale composto è considerato un'importante interferente endocrino e la sua attività simil-estrogenica è stata investigata in numerosi studi *in vivo* e *in vitro*. Tuttavia, mentre gli effetti citotossici del NP sono conosciuti, i suoi effetti sulla morte cellulare non sono noti. Abbiamo deciso di evidenziare gli effetti del NP su cellule immortalizzate di adenocarcinoma endometriale (Hec1A), e in particolare gli effetti su ciclo cellulare e apoptosi.

Materiali e metodi. Il ciclo cellulare è stato analizzato mediante citofluorimetria. Abbiamo evidenziato che il NP è in grado di inibire il ciclo cellulare e favorire l'apoptosi in maniera concentrazione- e tempo-dipendente, raggiungendo gli effetti maggiori alla concentrazione di 10^{-8} M per 48h. La citofluorimetria ha evidenziato che il NP è in grado di determinare il blocco delle cellule in fase G2/M e di incrementare la percentuale di cellule in apoptosi.

Conclusioni. Il nonilfenolo rappresenta un fattore di tossicità per le cellule endometriali. Studi futuri sono tuttavia necessari per dimostrare la nostra ipotesi secondo la quale l'esposizione al NP rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma endometriale.

SUMMARY: Nonylphenol and endometrial cancer: effects on cell cultures *in vitro* at different concentrations.

V. FREGA, E. TRABUCCO, M.A. CASTALDI, O. BOCCIA, L. MOSCA, G. FATIGATI, N. COLACURCI, A. DE LUCA, L. COBELLIS

Objectives. Nonylphenol (NP) is present ubiquitously in both aquatic and terrestrial environments. This compound is considered an important endocrine disruptor and its toxic/estrogenic activity has been investigated in a number of *in vitro* and *in vivo* studies. Moreover, while the cytotoxic effects of NP are known and studied, its effects on cell death and related mechanisms are not known. Our group decided to investigate NP effects on endometrial carcinoma cells (Hec1A), in particular NP effects on Hec1A cell cycle and apoptosis.

Materials and methods. We tested Hec1A cells with different NP concentrations. Cell cycle was analysed by flow cytometry. We have demonstrated that NP affected cell cycle and apoptosis in a time- and dose-dependent manner, reaching the most notable effect at concentration of 10^{-8} M for 48h. Flow cytometry revealed that treatment with NP led to accumulation of cells at G2/M transition and increased percentage population of apoptotic cells.

Conclusions. Nonylphenol represents a toxicity factor for endometrial cells. Future studies are necessary to demonstrate our hypothesis, which is this compound is able to promote the development of endometrial cancer.

KEY WORDS: Nonilfenolo - Adenocarcinoma endometriale - Ciclo cellulare - Apoptosi.
Nonylphenol - Endometrial cancer - Cell cycle - Apoptosis.

Introduzione

Il carcinoma dell'endometrio, o del corpo dell'utero, rappresenta attualmente una delle più frequenti neoplasie dell'apparato genitale femminile in molti

Paesi del mondo (1,2). Il carcinoma dell'endometrio si presenta soprattutto verso i 55-65 anni (età media 61 anni) e solo nel 20% dei casi prima che sia iniziata la menopausa. È raro prima dei 40 anni (3-5% dei casi) (3). L'incidenza varia ampiamente secondo i Paesi e la razza; attualmente si pensa che in Italia insorgano circa 20 cancri invasivi dell'endometrio ogni 100.000 donne all'anno. Questa neoplasia in Italia rappresenta il 5-6% dei tumori femminili con una prevalenza di 850 casi/anno.

Seconda Università di Napoli
¹ Dipartimento di Scienze Ginecologiche, Ostetriche e della Riproduzione
² Dipartimento di Medicina Pubblica, Clinica e Preventiva,
Sezione di Anatomia Umana

I fattori di rischio più importanti sono sicuramente rappresentati da *obesità, menopausa tardiva, nulliparità e uso prolungato di estrogeni* e tale rischio si accentua se si associa più di un fattore, per esempio l'eccesso di peso associato all'uso prolungato di estrogeni (4). Circa gli estrogeni endogeni, esistono dati epidemiologici che confermerebbero la loro importanza: le donne con anovulazione cronica (sindrome dell'ovaio policistico), e quindi caratterizzate dalla prevalenza costante della secrezione estrogenica, quelle con *deficit* del corpo luteo, e quindi anche in questo caso con mancata azione periodica efficace del progesterone, e le donne con tumori ovarici della teca e della granulosa estrogeno-secerenti sarebbero più esposte al rischio di sviluppare carcinoma dell'endometrio.

Data l'influenza che l'esposizione ad elevati livelli di estrogeni sembra mediare sullo sviluppo del carcinoma dell'endometrio, la nostra attenzione si è focalizzata su una serie di molecole appartenenti alla categoria degli *Endocrine Disrupting Compounds* (EDCs) che mostrano notevole affinità strutturale con il più potente estrogeno prodotto fisiologicamente dall'organismo umano: il 17 β -estradiolo. Si tratta degli alchilfenoli etossilati (APEO), tensioattivi non ionici che vengono prodotti in quantità di 700.000 t/anno e trovano impiego in molte applicazioni domestiche, agricole e industriali. I maggiori costituenti degli APEO sono i nonilfenoli etossilati (NPEO), i cui principali derivati metabolici, quali il nonilfenolo (NP), i nonilfenoli mono- e dietossilati (NPE1C, NPE2C) sono quelli che maggiormente vengono riversati nell'ambiente acquatico (5).

I primi studi riguardanti gli effetti del NP sugli organismi viventi sono stati condotti su varie specie acquatiche quali alghe, crostacei, molluschi e pesci. In questi organismi viventi si è visto che, in virtù della somiglianza strutturale sussistente tra NP e 17 β -estradiolo, numerose sono le alterazioni endocrine evidenziabili dopo un'esposizione che va da 0.1 a 100 μ g/l. Tra queste, ricordiamo la femminilizzazione dei maschi e le alterazioni a carico degli organi sessuali nelle femmine (6). Bisogna sottolineare che non esistono in letteratura molti riferimenti agli effetti patogeni che il NP esercita sull'uomo; sono tuttavia presenti alcuni riferimenti all'influenza che tale molecola potrebbe svolgere nell'eziologia di alcune patologie ginecologiche tra cui la poliabortività (7), l'endometriosi (8), la pubertà precoce (9) e il carcinoma mammario (10), motivo per cui abbiamo deciso di investigare gli effetti tossici del NP sulle cellule endometriali.

Lo scopo di tale studio è quello di valutare gli effetti di diverse concentrazioni di nonilfenolo su colture *in vitro* di adenocarcinoma dell'endometrio (Hec1A), con particolare riguardo agli effetti che questo inquinante è in grado di mediare a livello del ciclo cellulare

e dell'effetto pro-apoptotico, che rappresenta uno dei principali meccanismi attraverso il quale il nonilfenolo esprime la sua tossicità.

Materiali e metodi

Le cellule utilizzate per questo lavoro (cellule Hec1A) sono state acquistate presso l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Le cellule Hec1A sono state messe in coltura e cresciute a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Il mezzo di coltura in cui sono state mantenute è quello consigliato dall'ATCC, ossia DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*, Celbio), addizionato con 10% di FBS (*Fetal Bovin Serum*) e antibiotici. Le cellule sono state seminate in piastre a sei pozzetti alla concentrazione di 5x10⁴ cellule per pozzetto. Una volta raggiunta la confluenza del 90%, le piastre di cellule Hec1A sono state trattate con il nonilfenolo (NP).

È stato eseguito un esperimento preliminare per testare a quale concentrazione il nonilfenolo determinasse il minimo effetto tossico a carico delle cellule Hec1A, sulle quali pertanto sono state applicate diverse concentrazioni di NP: 10⁻⁵ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, per una durata massima di 48h. È stato osservato lo stato delle cellule al microscopio ottico a 24h e 48h ed è stata eseguita una curva di tossicità, sulla base della diversa morfologia che le cellule apoptotiche e necrotiche presentano rispetto a quelle vitali. Le concentrazioni di NP utilizzate nell'esperimento successivo sono state 10⁻⁷ M e 10⁻⁸ M. Le cellule sono state raccolte 24h e 48h dopo l'esposizione al nonilfenolo e preparate per l'analisi al citofluorimetro, per testare l'andamento del ciclo cellulare. Le cellule raccolte dopo il trattamento sono state lavate in PBS e fissate in etanolo al 70% a 4°C. Le cellule sono state successivamente risospese in 500 μ l di *buffer* ipotonico e poi analizzate con il citofluorimetro *Becton Dickinson FACSCalibur* per calcolare la percentuale di cellule in G1, S, G2/M e sub-G1 (cellule apoptotiche). I dati sono stati esaminati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test *post-hoc* Kruskal Wallis.

Risultati

Nel corso dell'esperimento preliminare, le cellule Hec1A sono state messe a contatto con diverse concentrazioni di NP (10⁻⁹ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M) per 24h e 48h per poi essere analizzate al citofluorimetro. In particolare si è visto che l'andamento del ciclo cellulare delle cellule trattate con NP 10⁻⁹ M era del tutto simile a quello dei controlli, sia dopo 24h

che dopo 48h, mentre a concentrazioni troppo alte (10^{-6} M e 10^{-5} M) non si evidenziavano cellule in apoptosi ma solo in necrosi. Sulla base di queste osservazioni abbiamo condotto l'esperimento successivo alle concentrazioni di 10^{-7} M e 10^{-8} M. I dati ottenuti dall'analisi delle cellule al citofluorimetro dimostrano che il NP è in grado di indurre inibizione della crescita e apoptosi. In particolare, si evidenzia un decremento massimo delle cellule in fase S (19,72%) nelle cellule trattate con NP 10^{-7} M per 48h. Si assiste inoltre ad una diminuzione delle cellule in fase G2/M, concentrazione- e tempo-dipendente; tale diminuzione diventa massima nelle cellule trattate con NP 10^{-7} M per 48h, dove si assiste ad un blocco totale di tale fase. Si è osservato inoltre che il trattamento con NP 10^{-7} M per 48h era in grado di determinare un aumento della percentuale di cellule apoptotiche (20,60%). Il trattamento con NP 10^{-8} M, invece, induceva accumulo delle cellule in fase G2/M con concomitante riduzione della popolazione cellulare in fase S, mentre non si osservava un evidente picco di cellule sub-G1. Questi dati sembrano indicare che le cellule Hec1A sono più responsive ad alte concentrazioni di NP (10^{-7} M), per quanto riguarda l'induzione all'apoptosi ($p < .001$) (Fig. 1).

Discussione e conclusioni

La maggior parte degli studi presenti in letteratura focalizza l'attenzione sugli effetti deleteri che il NP ha

sullo sviluppo degli organi sessuali nei ratti (11) e nei pesci (12), mentre molto più esigua è la quantità di dati riguardanti l'uomo. Esistono tuttavia degli studi che mettono in evidenza la correlazione esistente tra l'esposizione a NP e sviluppo di una serie di patologie ginecologiche, quali poliabortività (13), pubertà precoce, endometriosi (14) e carcinoma mammario (15): da qui il nostro interesse nei confronti del NP come possibile agente patogeno per il carcinoma endometriale. Il NP agirebbe da tossico in quanto agonista del recettore degli estrogeni a causa delle somiglianze strutturali che sussistono tra il NP e il 17β -estradiolo (16). Tuttavia tale meccanismo è solo uno di quelli che spiegano il ruolo patogeno che il NP svolge nell'ambito delle patologie ginecologiche; c'è da ricordare, infatti, il ruolo da antagonista che svolge nei confronti del recettore per gli androgeni (17) e gli effetti disregolatori che il tossico determinerebbe sul sistema immunitario dell'uomo (18). Non meno importante è la capacità del NP di interferire con il ciclo vitale delle cellule con le quali viene a contatto, e nello specifico la capacità di indurre delle modifiche nella concentrazione delle cicline e la capacità di indurre l'attivazione del meccanismo dell'apoptosi caspasi-dipendente. Attraverso il nostro studio abbiamo evidenziato come il NP sia in grado di interferire con i meccanismi che sottendono alla sopravvivenza delle cellule con le quali esso viene a contatto, nello specifico le cellule endometriali, alterandone in maniera profonda il ciclo vitale in maniera concentrazione- e tempo-dipendente e favorendo l'attivazione del meccanismo dell'apoptosi. Sulla base dei

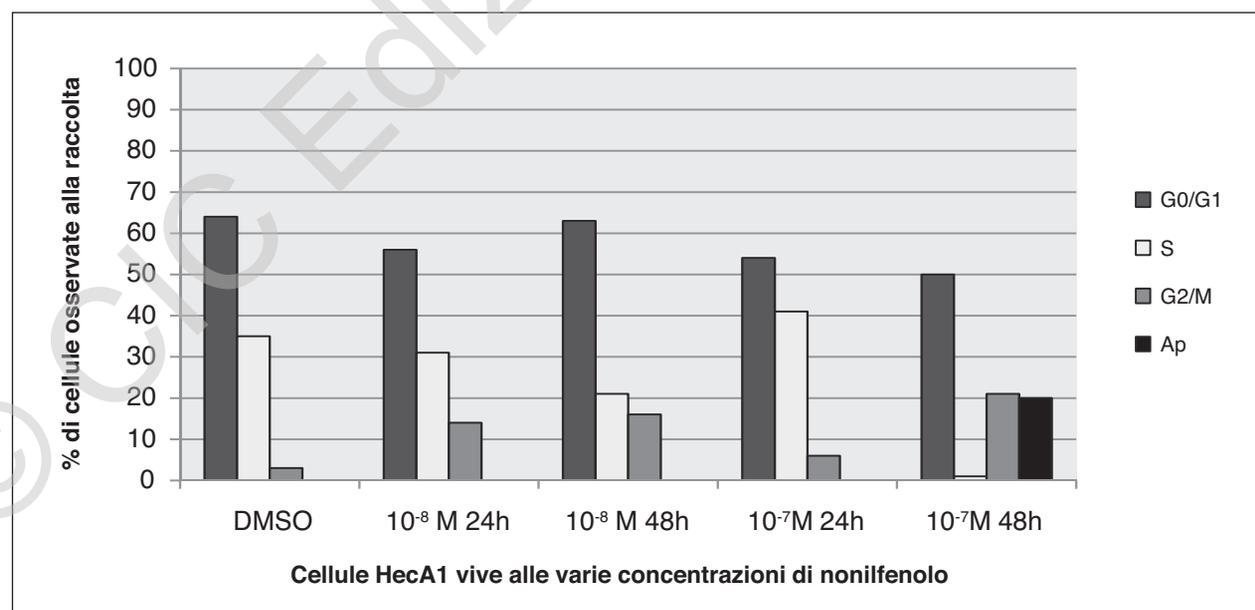


Fig. 1 - Rappresentazione schematica dei risultati dell'analisi al citofluorimetro degli esperimenti condotti utilizzando concentrazioni diverse di NP su cellule Hec1A. In particolare, solo con NP 10^{-7} M per 48h si osserva la presenza di cellule apoptotiche (Ap) e il concomitante decremento massimo delle cellule in fase S ($p < .001$).

risultati ottenuti, possiamo quindi ipotizzare che l'esposizione al NP ad alte concentrazioni possa essere in grado di determinare la morte cellulare, mentre l'esposizione a basse concentrazioni, come quella che si verifica ogni giorno attraverso la via alimentare, possa co-

stituire un fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma dell'endometrio. Studi futuri sono di conseguenza necessari per verificare tale ipotesi e per valutare quali siano eventualmente i meccanismi molecolari attraverso i quali il NP media l'effetto cancerogeno.

Bibliografia

1. Mutch DG. Uterine Cancer. In Scott JR, Gibbs RS, Kaarlan BY, Haney AF: Danforth's Obstetrics and Gynecology. 9^a edition. Lippincott, Philadelphia, 2003.
2. Bonadonna V, et al. Tamoxifen and endometrial cancer: the results from a multi-centric case-control study. *Bull. Cancer* 1996;83:507.
3. Neven P, Vergote I. Controversies regarding tamoxifen and uterine cancer. *Current Opin. Obstet. Gynecol.* 1998;10:9.
4. Heintz APM. Surgical Principles of cervical and endometrial cancer. In Heintz, Allen (Eds): *Practical procedures for the Gynecological oncologist*. Elsevier, Amsterdam, 1998.
5. Maoffat GJ. Screening of chemicals for effect on uterine growth in immature female rats: Nonylphenol, octylphenol and nonylphenoxyacetic acid. ICI report No. CTL/R/1249, 1996.
6. Buck GM, Mendola P, Vena JE, Sever LE, Kostyniak P, Grieserstein H, Olson J, Stephen FD. Paternal Lake Ontario fish consumption and risk of conception delay, New York State angler cohort. *Environ Res* 1999;80:S13-S18.
7. Hassan MA, Killick SR. Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertil Steril* 2004;81:384-392.
8. Rier S, Foster WG. Environmental dioxins and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003;21:145-54.
9. Mills JL, Stolley DD, Davies J, Moshang T. Premature thelarche. Natural history and etiologic investigation. *Am J Dis Child* 1981;135:743-45.
10. Limer JL, Speirs V. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res* 2004;6:119-127.
11. Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol. Sci.* 2000;54:154-67.
12. Odum J, Pyrah IT, Foster JR, Van Miller JP, Joiner RL, Ashby J. Comparative activities of p-nonylphenol and diethylstilbestrol in noble rat mammary gland and uterotrophic assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1999;29:184-95.
13. Fuortes L, Clark MK, Kirchner HL, Smith EM. Association between female infertility and agricultural work history. *Am J Ind Med* 1997;31:445-51.
14. Mayani A, Barel S, Soback S, Almagor M. Dioxin concentration in women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997;12:373-75.
15. Lu L-J W, Anderson KE, Grady JJ, Kohen F, Nagamani M. Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention. *Cancer Res* 2000;60:4112-21.
16. Preuss TG, Gurer-Orhan H, Meerman J, Ratte HT. Some nonylphenol isomers show antiestrogenic potency in the MVLN cell assay. *Toxicol In Vitro* 2010 Feb;24(1):129-34.
17. Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Qian J, Song L, Wang XR. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 2005 Dec 15;216(2-3):197-203.
18. Karrow NA, Guo TL, Delclos KB, Newbold RR, Weis C, Germolec DR, White KL Jr, McCay JA. Nonylphenol alters the activity of splenic NK cells and the numbers of leukocyte subpopulations in Sprague-Dawley rats: a two-generation feeding study. *Toxicology* 2004;196:237-45.