

Titolo

Nei carcinomi mammari il riscontro dell'over-espressione di GH/ GHR ne conferma il ruolo oncogeno e conseguentemente quello oncosoppressore del suo fisiologico inibitore, la somatostatina

AUTHORS

Giuseppe Di Bella¹, Biagio Colori², Rosilde Toscano¹,

¹ Di Bella Foundation, Via Guglielmo Marconi 51 Bologna, 40122 Italy

² Rizzoli Scientific Research and Care Institute, Via Giulio Cesare Pupilli, 40136 Bologna, Italy

Correspondence to: Dr. Giuseppe Di Bella

Di Bella Foundation

Via Marconi 51, Post code 40122, Bologna, Italy.

tel: +39 051 239662; +39 051 230369;

e-mail: posta@giuseppedibella.it

Parole chiave

Breast Cancer, GH, GHR, IGF-1, Somatostatin, Growth Factors, Estradiol, Prolactin.

Abstract

L'interazione tra ormoni pituitari, (Growth Hormon – Prolattina), ovarici (Estradiolo), fattori di crescita, è alla base dei meccanismi della crescita neoplastica del seno. La letteratura ha documentato l'espressione dell'asse mitogeno GH (Growth Hormon) /IGF1 (Insulin-Like Growth Factor) e GHR (Growth Hormon Receptor)in misura superiore nei tessuti neoplastici rispetto ai sani, con rapporto dose dipendente tra GH/IGF1/GHR e indice proliferativo e capacità invasive in numerose neoplasie. Per cercare di migliorare la prognosi del tumore della mammella, ancora prima causa di morte delle donne, abbiamo condotto ricerche sperimentali su un aspetto che riteniamo ancora sottovalutato: il ruolo mitogeno del GH e la razionalità dell'impiego antitumorale della sua inibizione mediante il suo antidoto fisiologico la somatostatina. **Materiali e metodi:** Sono stati valutati 59 casi di carcinoma mammario suddivisi in “Alto Rischio” (20 casi), “Rischio Intermedio” (13 casi) e “Basso Rischio” (6 casi) in base ad un algoritmo di predizione. È emerso che carcinomi mammari ad alto e rischio intermedio di sviluppare recidive sono caratterizzati da un'over-espressione di GH e del suo recettore (GHR). **Conclusioni:** l'over-espressione di GH-GHR nei

tumori della mammella con rapporto proporzionale all'aggressività conferma la possibilità di migliorarne la prognosi associando al blocco estrogenico l'inibizione dell'asse mitogeno GHI-GF1-PRL mediante somatostatina e inibitori prolattinici D2R agonisti.

INTRODUZIONE

Su base endocrina, biologica, biochimica, è documentato ed evidente il ruolo primario sia nella crescita fisiologica che neoplastica dell'asse GH-IGF1 e degli fattori di crescita correlati, VEGF-A, EGF, GH correlati, in sinergismo con la prolattina, e nei tumori della mammella, con l'estrogeno. Il GH è un ormone peptidico composto da 191 amminoacidi con un peso di 22.005 Da, sintetizzato, accumulato e secreto dalle cellule dell'Adenoipofisi. Tra le numerose funzioni svolte dal GH:

- regolazione della crescita dell'organismo
- regolazione della proliferazione e differenziazione cellulare
- regolazione del metabolismo (di proteine, lipidi e carboidrati)
- aumento della sintesi proteica nelle cellule con meccanismi multipli tra cui:
 - Attivazione di alcuni trasportatori di amminoacidi della membrana plasmatica determinandone un maggiore ingresso nel citoplasma.
 - traduzione degli mRNA cellulari anche in assenza di una concentrazione di amminoacidi superiore alla norma,
 - aumento della sintesi proteica da parte di ribosomi

Il GH è il principale mediatore della crescita postnatale delle cellule somatiche [1], i suoi effetti sulla crescita e differenziazione cellulare sono mediati attraverso l'interazione col recettore (GHR) [1-2] che attiva vie di trasduzione del segnale critiche per la crescita cellulare e la sopravvivenza compresi i trasduttori del segnale (JAK-2 / STAT), la cascata della proteina chinasi mitogeno attivata (/ P44 / 42 (MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase), e della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) [1-2]. Il recettore del GH appartiene alla grande famiglia dei recettori delle citochine o ematopoietici, che non contengono il dominio della tirosin-chinasi nella loro regione citoplasmatica. La famiglia dei recettori di GH\citochine (Classe I) e la famiglia dei recettori di interferone (Classe II) condividono sia caratteristiche strutturali, recentemente identificate, che comuni vie di trasduzione del segnale. Inoltre, entrambe le classi di recettori sono associate con vari membri della famiglia delle Janus tirosin chinasi e attivano una nuova famiglia di fattori di trascrizione, noti come

trasduttori e attivatori della trascrizione, i quali mettono in relazione i ligandi all'attivazione dell'espressione genica [3].

Per capire le azioni del GH è fondamentale conoscere la struttura e l'espressione del suo recettore. La clonazione e il sequenziamento del recettore GH ha dimostrato che tale recettore non è omologo ad altri recettori di funzione nota, ma è un dato scientificamente e clinicamente rilevante per i suoi riflessi terapeutici l'omologia recettoriale Growth Hormon - Prolattina. Un'ampia distribuzione con concentrazioni variabili dei GHR è stata osservata in molti tipi di cellule sia normali che neoplastiche, con netta e significativa prevalenza nelle cellule tumorali proporzionale all'indice proliferativo e alla capacità invasiva e metastatizzante [4].

Non tutte, ma la maggioranza delle cellule che esprimono recettori della membrana citosolica e citoplasmatici del GH, ne hanno anche un'espressione nucleare. In generale, l'espressione di GHR è ricercata con varie tecniche immunoistochimiche, molecolari, western blot, scintigrafiche, ecc. Con un affinamento delle tecniche è ipotizzabile che si possano individuare GHR nucleari in tutte le cellule. È stata anche documentata la sintesi citoplasmatica di GHR a livello del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi [5]. È stato mostrato che il GH nel siero circola complessato con GHBP (Growth Hormone-Binding Protein) [6-7].la GHBP sierica umana contiene la porzione extra cellulare del GHR e può essere prodotta da uno specifico taglio proteolitico del dominio extracellulare del GHR [8]. La porzione proteica extracellulare che lega l'ormone è quindi comune sia al GHR che al GHBP. Anche il recettore nucleare possiede la stessa porzione proteica che lega il GH presente sia nel GHR che nel GHBP [9]. La presenza di GHR nel nucleo suggerisce che il GH internalizzato nella cellula può modulare la trascrizione di specifici geni. È altamente probabile un effetto diretto del GH nell'espressione genica. Il GHR condivide due proprietà dei proto-oncogeni:

- 1) la lunghezza della regione 5' non tradotta del cDNA del recettore è significativamente più lunga della media
- 2) Il GH possiede due siti di inizio della trascrizione a monte del sito di inizio della traduzione. Entrambe queste caratteristiche sono in comune nell'mRNA che codifica per proto-oncogeni.

L'espressione del gene IGF-1 è regolata diversamente dal GH in differenti tessuti [10]. La dipendenza dal GH di IGF-1 è stata ampiamente confermata negli esseri umani. In pazienti con completa deficienza di GH, i livelli di IGF-1 sono sempre diminuiti, con i livelli più bassi trovati nei pazienti con il nanismo di Laron in cui mancano i GHR [11]. La somministrazione di GH induce un aumento nell'IGF-1 nei pazienti responsivi al GH. Tuttavia non è necessaria la co-localizzazione

di IGF-1 e GHR poichè il ruolo del GH nelle cellule tumorali può essere di regolare la funzione delle cellule mature piuttosto che promuovere la proliferazione cellulare mediante la sintesi locale di IGF-1. Questi due ormoni non sempre agiscono in serie; in alcuni tessuti la sintesi di IGF-1 è indipendente dal GH [12], malgrado il fatto che questi tessuti possiedono il GHR, come evidenziato da una potente mitogenesi indipendente da IGF-1 in risposta al GH [13]. Devono essere approfonditi gli studi per stabilire se, e in quali condizioni, in quali tessuti il GH possa agire indipendentemente dalla sintesi di IGF-1 nelle cellule tumorali umane.

Elevata concentrazione del recettore è stata costantemente osservata anche in linee cellulari derivate da tessuti in fase di crescita esponenziale. La proteina che lega il GH nel nucleo risulta avere gli stessi siti di legame per i GHR citoplasmatici e di membrana. L'asse GH / IGF-1 è il principale mediatore della crescita somatica, e durante l'infanzia svolge un ruolo essenziale nello sviluppo della ghiandola mammaria regolando la proliferazione cellulare, differenziazione e apoptosi [14]. È pertanto un'evidenza scientifica nella genesi tumorale il ruolo determinante dell'asse GH / IGF-1 [15], e la sua stretta interazione recettoriale, funzionale, proliferativa con l'altro increto ipofisario la prolattina, con altri fattori di crescita Gh correlati come VEGF, EGF.

Revisione degli studi clinici e sperimentali a conferma delle proprietà mitogene del GH e dei relativi meccanismi d'azione biochimici e molecolare

– **Nei carcinomi del seno**

- L'espressione GHR è associata alla trasformazione maligna della ghiandola mammaria in rapporto dose dipendente [5];
- GH umano ricombinante aumenta la proliferazione nei tumori del seno [16];
- incremento di incidenza e aggressività di neoplasie maligne secondarie tra cui seno in pazienti del Childhood Cancer Survivor Study trattati con rhGH per massimizzare la crescita [17-20];
- IGF-1, il mitogeno che funge da intermediario nell'azione del GH, è sovra espresso nel carcinoma della mammella e il legame di IGF-1 è più elevato nel tessuto tumorale mammario rispetto al tessuto normale adiacente [21-22];

- nel carcinoma mammario umano è stata identificata l'espressione della proteina e dell'mRNA di GHR [23-24];
- linee cellulari di carcinoma mammario producono e secernono IGF-1 [25];
- è documentato che il GH umano ricombinante aumenta la proliferazione nei tumori del seno [16];
- l'aumento dei livelli di HGHR mRNA in campioni di carcinoma mammario umano rispetto al tessuto normale adiacente [26];
- la RT-PCR e L'analisi Western hanno dimostrato l'espressione di GHRH e del suo recettore nel tessuto del cancro al seno, e antagonisti di GHRH inibiscono la crescita dei tumori [27]
- le proteine che regolano la secrezione di hGH da parte dell'ipofisi sono state implicate nella neoplasia mammaria [28-29];
- l'induzione all'espressione forzata di Pit-1 aumenta l'espressione di GH mRNA e della proliferazione nelle cellule di carcinoma mammario umano [30];
- il Gh favorisce l'immortalizzazione di linee cellule epiteliali mammarie attraverso l'incremento dei livelli di mRNA e di proteine della subunità catalitica della telomerasi, hTERT [31-33];
- il GH autocrino inibisce i meccanismi di ancoraggio e adesività nelle cellule di carcinoma mammario e di crescita tumorale in vitro [34], [35];
- l'espressione di hGH autocrino soddisfa quindi i criteri per essere considerata come un oncogene per cellule mammarie umane [5];
- l'espressione di GH in cellule MCF-10A sconvolge la normale architettura acinare mammaria inducendo un riempimento del lume per sovvertimento dell'architettura e dell'ordine proliferativo [2];
- GH aumenta la metastatizzazione di carcinomi mammari mediante l'interruzione del contatto cellula – cellula e aumento della migrazione e invasione cellulare [35];
- IGF-1(GH-correlato), è sovra espresso nel carcinoma della mammella [22];
- GH è più elevato nel tessuto tumorale mammario rispetto al tessuto normale adiacente[21];
- recenti studi hanno dimostrato che l'espressione GH può aumentare l'attività della telomerasi ed estendere la capacità replicativa di una linea cellulare epiteliale mammaria primaria [31];

In generali nelle neoplasie

- GH aumenta significativamente l'espressione del proto-oncogene c-myc [36];

- GH ad alta concentrazione accelera direttamente la crescita del sarcoma osteogenico inducendo parallelamente elevati livelli di somatomedine [37-38];
- GH accelera la crescita del mieloma multiplo [39];
- l'asse GHI/GF1 è altamente rappresentato nel tessuto polmonare neoplastico umano ottenuto subito dopo chirurgia, rispetto al tessuto polmonare circostante sano [40];
- livelli plasmatici elevati di GH sono stati documentati in numerose neoplasie umane [41-42];
- nei tumori ossei è stata documentata un'aumentata concentrazione di GH [38];
- nel mieloma multiplo è stata riscontrata un'alta, significativa concentrazione di GH [39];
- nel tessuto polmonare neoplastico umano ottenuto subito dopo chirurgia, si sono riscontrate concentrazioni di IGF-1- GH dipendente, nettamente maggiori rispetto al normale tessuto circostante [40];
- incremento di incidenza e aggressività del Linfoma di Hodgkin e del cancro del colon-retto in pazienti trattati con hGH durante l'infanzia o nella prima età adulta [43];
- IGF-1 è sovraespresso nei carcinomi del colon ed [44];
- diversi studi clinici e case reports hanno evidenziato un'aumentata incidenza di polipi, adenomatosi del colon e carcinoma del colon in pazienti con acromegalia [45-48];
- l'espressione dei GHR è stata accertata nella membrana cellulare, nel citoplasma, nel nucleo di tessuti normali e in maggiori concentrazioni nelle cellule tumorali [5];
- l'espressione del GH autocrino promuove la proliferazione cellulare [34];
- GH autocrino è il primo esempio di un gene umano che può sia potenzialmente immortalare e sia trasformare oncogenicamente la cellula epiteliale umana [5];
- il GH promuove la conversione fenotipica di cellule da una morfologia epiteliale a mesenchimale (EMT) con l'acquisizione di un fenotipo migratorio e invasivo epiteliomesenchimale, attraverso la down regulation di plakoglobin, rilocalizzazione di E-caderina al citoplasma, e una maggiore attività delle metalloproteasi 2 e 9 della matrice (MMP) [35], [49-50];
- GH promuove la migrazione delle cellule endoteliali e l'angiogenesi, aumenta i livelli di VEGF-A mRNA e [51] (Fig. 3) mediante down-regulation della trombospondina 1 (TSP1) inibitrice del fenotipo angiogenico [52];
- la trasduzione di GH determina una significativa induzione di numerosi geni di induttori angiogenici come la sintasi endoteliale ossido nitrico (eNOS), e di fattori di crescita angiogenici come VEGF e fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF) mentre l'analisi

immunoistochimica ha rivelato un aumento della densità capillare e proliferazione cellulare [53];

- l'asse GH/IGF-1 ha un effetto protettivo contro la morte cellulare programmata indotta da radiazioni [54-55];
- GH inibisce percorsi di apoptosi regolando negativamente geni di arresto della crescita cellulare come gadd153 / CHOP (C / EBP) proteggendo così le cellule tumorali anche dallo stress ossidativo [56];
- GH è radioprotettivo in diverse linee cellulari di carcinoma mammario [51];
- inoltre, la sovraespressione di HGHR mRNA e di proteine predice la risposta alla radioterapia nel carcinoma rettale [57];

Si può ormai estendere nei tumori del seno, il concetto di Asse proliferativo binario GH/IGF1 ad Asse quaternario GH/IGF1/PRL/ER. E' ormai documentato infatti il sinergismo mitogeno dell'Ormone della crescita col Fattore di crescita Simil Insulinico-1, con la Prolattina e gli Estrogeni nei tumori del seno. [58]. Riteniamo utile ripetere e sottolineare il dato che la maggior parte degli effetti mitogeni del GH nelle cellule somatiche oltre che dal IGF-1 epatico è mediata dall'induzione dell'espressione di altri fattori di crescita come EGF [59], e di VEGF-A [60]. Il legame tra GH e GHR oltre alla documentata regolazione positiva di IGF1, EGF, VEGF attiva la trasduzione di segnale di diversi pathway tra cui JAK-2/STAT, MAPK, PIK3.

È significativo il dato documentato che gli acromegalici abbiano un aumentato rischio di cancro del colon-retto [61]. Nel 40% delle pazienti affette da cancro al seno sono stati osservati elevati livelli sierici di GH [62] e conseguentemente di IGF-1, [15], [63-64]. Anche in altre neoplasie, come le malattie linfoproliferative, è documentata l'espressione di GHR coerentemente con la sua presenza in linfociti umani coltivati (IM 9 cell line) evidenziata con ligandi radiomarcanti [65]. L'asse GH/IGF-1 modula anche il sistema immunitario anche se non sono state evidenziate le modalità e i rapporti proporzionali di questa interazione. GH regola direttamente la funzione dei linfociti mediante il proprio recettore [66], o con azione mediata da IGF-1 [67]. L'aumento di GHR nei melanociti, nevi, melanomi primari e melanomi metastatici evidenzia la sua attivazione della progressione tumorale anche in queste patologie. L'espressione di GHR sia nell'iperplasia prostatica benigna, che nel carcinoma della prostata è proporzionale, con rapporto dose dipendente con l'aggressività e l'indice proliferativo di questi cloni cellulari [68-70]. Per confermare sperimentalmente e valorizzare clinicamente questi dati scientifici la Fondazione Giuseppe Di Bella

ONLUS (nata per la ricerca medico – scientifica senza fini di lucro)ha formulato un progetto di ricerca e ne ha affidato la conduzione all'istituto di Anatomia patologica della nostra Università. Lo studio è stato finalizzato a ricercare nei cloni cellulari neoplastici del seno l'espressione di GH e GHR. La ricerca era volta anche ad accertare la relazione positiva, l'eventuale rapporto dose dipendente tra concentrazione di GH, GHR, aggressività, indice proliferativo, resistenza e metastatizzazione, verificando, così, la razionalità e le basi scientifiche dell'impiego del suo fisiologico inibitore, la somatostatina e analoghi.

Lo scopo del progetto era quello di testare l'espressione di un set di geni correlati con il pathway di GH tramite protocolli di real-time quantitative PCR partendo da tessuti umani fissati in formalina e inclusi in paraffina.

Materiali e metodi

Studio dell'espressione del GH e del suo recettore nei carcinomi mammari –

Sono stati valutati 59 casi di carcinoma mammario selezionati in “Alto Rischio” (20 casi), “Rischio Intermedio” (13 casi) e “Basso Rischio” (6 casi) in base ad un algoritmo di predizione messo a punto presso il laboratorio di Biologia Molecolare del nostro Ospedale. Sono stati analizzati gli mRNA di 18 geni: *GHR*, *GH1*, *TFF3*, *IGF1*, *BCL2*, *GHRH*, *GHRHR*, *HGF*, *HOXA1*, *KI67*, *PDGFA*, *PRL*, *PRLR*, *VEGFA*, *SERF1*, *FGF18*, *PRC1*, *MMP9*. I geni *ACTB* e *B2M* sono stati utilizzati come geni housekeeping.

L'RNA è stato quindi estratto da 4 fette di tessuto da 20µm fissato in formalina e incluso in paraffina. Brevemente, in seguito alla paraffinatura tramite passaggi in xilolo ed etanolo, il campione è stato estratto utilizzando il kit High Pure miRNA Isolation Kit (Roche Applied Science) ed eluito in 50 µl di Elution Buffer.

L'RNA così estratto è stato quindi retro trascritto tramite il Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science) ed il cDNA ottenuto è stato analizzato tramite Real-Time qPCR. I primers sono stati disegnati utilizzando i software Primer3, repeatmasker, Mfold, PrimerBlast. Un gene è stato considerato up-regolato con un fold-change (FC) ≥ 2 , mentre è stato considerato down-regolato con $FC < -2$. I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite DataAssist v 3.01.

È emerso che carcinomi mammari ad alto e rischio intermedio di sviluppare recidive sono caratterizzati da un'over-espressione di GH e del suo recettore (GHR).

Risultati

Sulla base di questo studio, i casi classificati come “Alto rischio” e “Rischio Intermedio” mostrano una overespressione ($FC \geq 2$) dei geni *GH* e *GHR* rispetto ai campioni classificati come “Basso Rischio” (Figure 1-3). Il gene *GHRH* è risultato essere invece down-regolato ($FC < -2$) nei gruppi “Alto rischio” e “Rischio intermedio” (Figure 1-3).

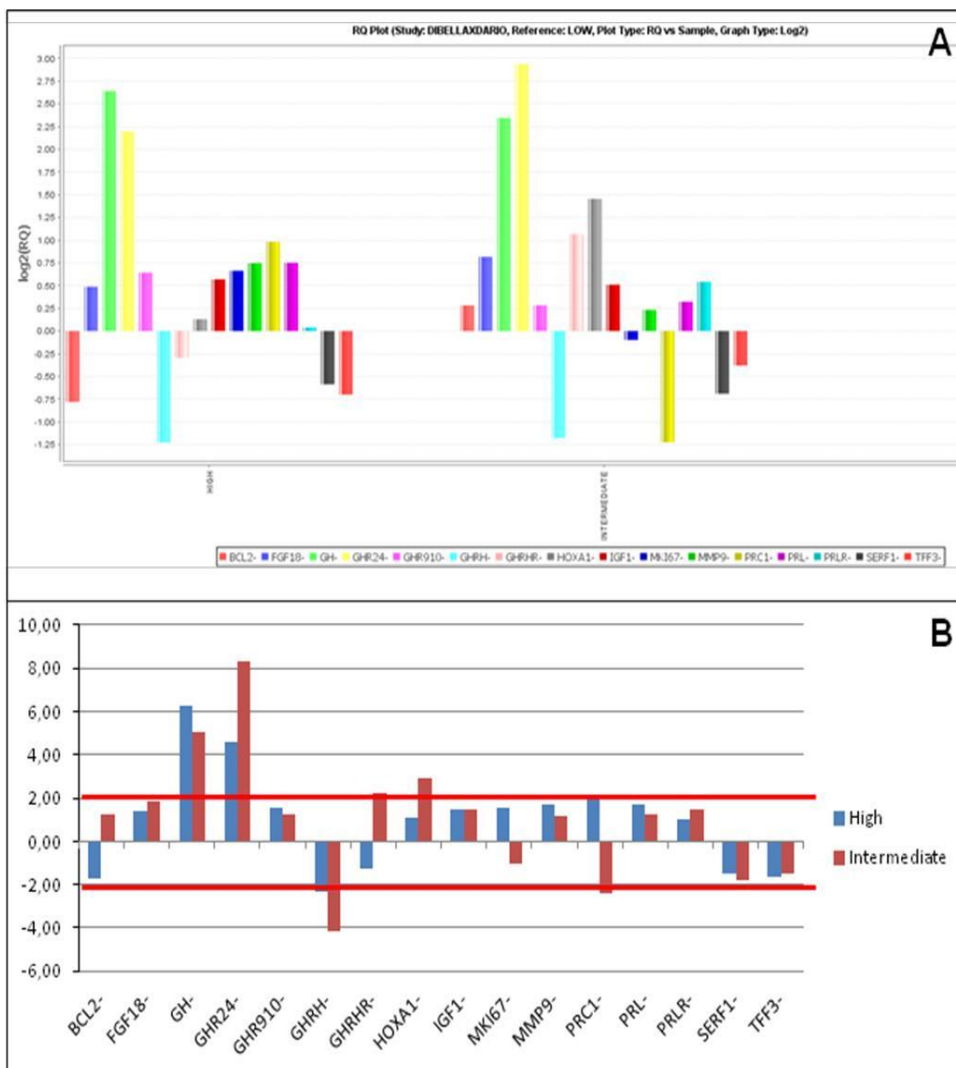


Figura 1. Profilo d'espressione dei casi di carcinoma mammario analizzati.

A) Valori d'espressione nei due gruppi “Alto rischio” e “Rischio Intermedio”.

B) Valori d'espressione dei singoli geni; le linee rosse indicano il cut-off del FC di 2.

Lo stesso risultato è stato osservato considerando come un unico gruppo i campioni “Alto Rischio” e “Rischio Intermedio” e confrontandoli con il profilo d’espressione dei campioni a “Basso Rischio” (Figura 2). GH e GHR sono risultati essere up-regolati (con un FC rispettivamente di 5,95 e 5,88 volte), mentre GHRH è risultato down-regolato (FC= -2,58).

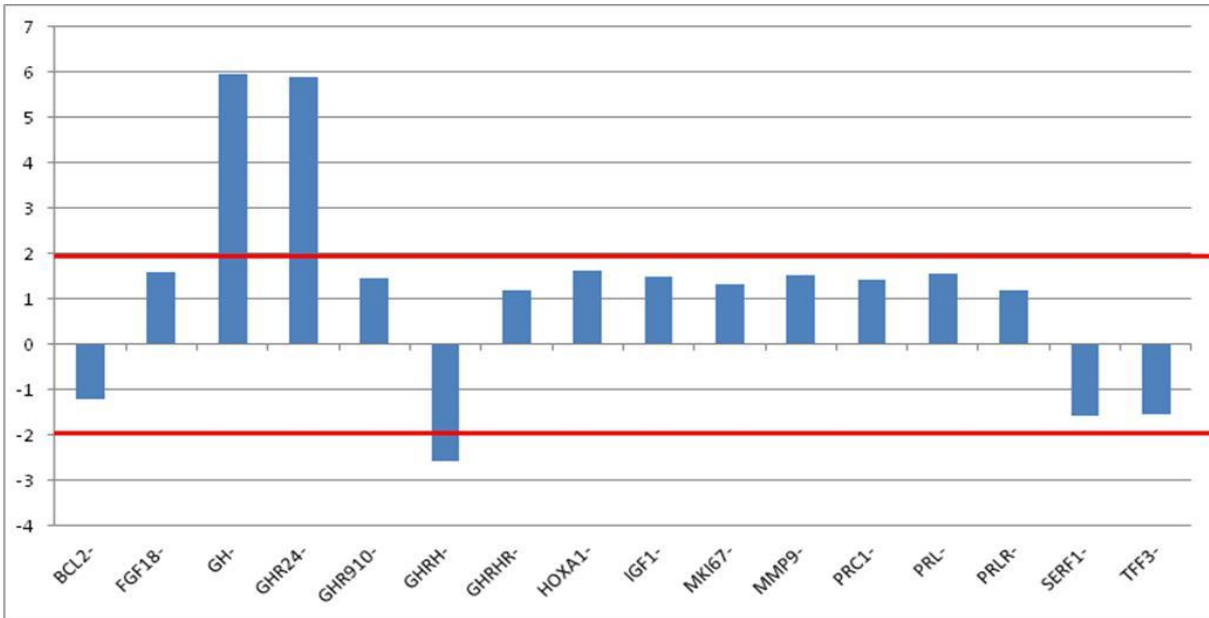


Figura 2. Profilo d’espressione dei geni analizzati considerando il gruppo a rischio “Alto+Intermedio” verso il gruppo a “Basso Rischio”. Le linee rosse indicano il cut-off del FC di ± 2

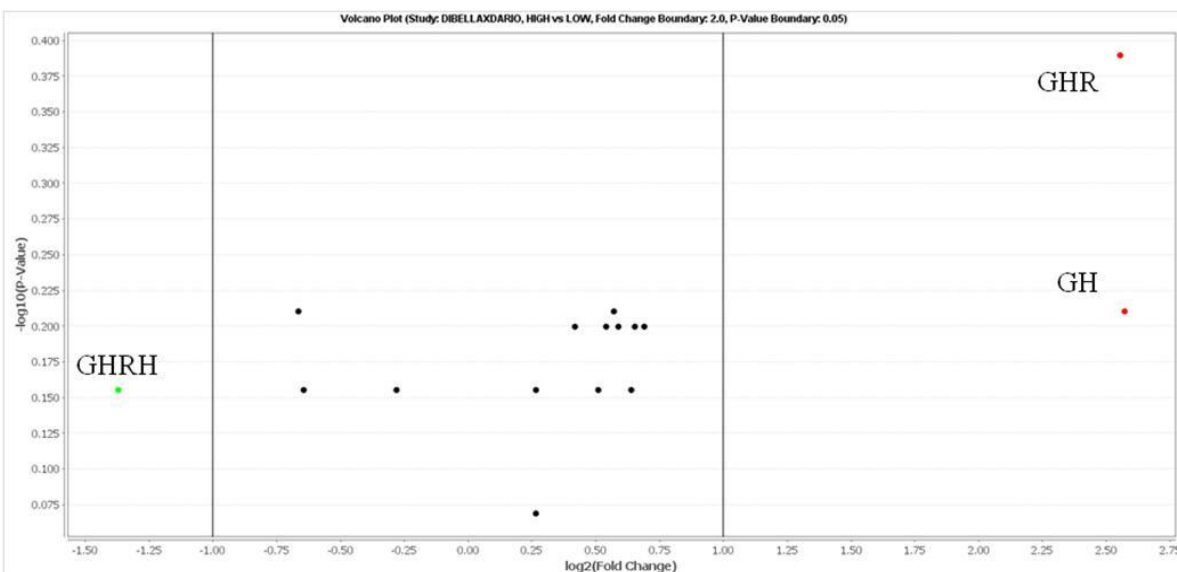


Figura 3. Volcano plot mostrante l'over-espressione del *GH* e *GHR* (punti rossi) e la down-regolazione del *GHRH* (punto verde) nei gruppi "Alto rischio" e "Rischio Intermedio".

I geni *HOXA1* e *PRCI* risultano essere rispettivamente up-regolato ($FC > 2$) e down-regolato ($FC < 2$) nel gruppo "Rischio intermedio" ma non in quello "Alto rischio" (Figura 1A).

Discussione

Considerando che ulteriori casi devono essere analizzati per avere dati definitivi, da questa prima analisi effettuata è emersa una chiara conferma dei dati emergenti in letteratura relativamente alla over-espressione sistematica di GH, IGF1, GHR non solo nei carcinomi della mammella, ma in tante forme tumorali anche istologicamente dissimili. La nostra ricerca ha confermato che in generale carcinomi mammari a rischio alto e intermedio di recidive sono caratterizzati da un'over-espressione di GH e del suo recettore (GHR). Una convalida evidente anche se indiretta viene da recenti studi clinici osservazionali retrospettivi. Questi hanno confermato e documentato sia nei tumori della mammella [71-73], che in tante altre neoplasie non neuroendocrine, come sarcomi [74], glioblastomi [75], neuroblastomi [76], carcinomi cervico-facciali [77], tumori esofagei [78], carcinomi polmonari non a piccole cellule [79], leucemie linfatiche croniche [80-81], linfomi Hodgkin e Non Hodgkin [82] l'evidente efficacia antitumorale dell'inibizione del GH, mediante il suo fisiologico antidoto, la somatostatina.

Conclusioni

Questi dati sperimentali e clinici, coerenti con la funzione biologica del GH, confermano ulteriormente l'induzione oncogena della sua over-espressione e il rapporto dose dipendente tra la entità dell'espressione di GH/IGF1/GHR e caratteristiche proliferative e aggressive dei cloni neoplastici, [83]. Anche il GH autocrino attraverso la regolazione differenziale dell'espressione genica regola meccanismi molecolari e biochimici vitali come la crescita cellulare e la sopravvivenza, la migrazione e l'invasione, la transizione epiteliomesenchimale (EMT), il potenziale replicativo e la trasformazione oncogena. Sono noti i geni che il GH autocrino regola positivamente o negativamente per indurre l'oncogenesi. [84].

Queste evidenze scientifiche validano pertanto pienamente la razionalità dell'impiego generalizzato in oncoterapia della somatostatina che agisce indifferentemente e parimenti sul GH pineale e su quello autocrino del tutto indipendentemente dalla presenza o meno di SSTR nelle cellule neoplastiche. Essendo over-espressi, anche se in misura diversa, in tutte le neoplasie, il GH e i fattori di crescita correlati, con attivazione di numerose vie di segnalazione proliferative e

angiogeniche, è logica la regolazione negativa del GH mediante la somatostatina che si estende ai fattori di crescita correlati, come ormai documentato ampiamente in letteratura.

E' pertanto giustificato l'impiego antitumorale generalizzato della somatostatina, in quanto antagonizza i denominatori comuni, e fattori causali di tutte le neoplasie, l'over-espressione dell'asse Growth hormon- Growth Factors correlati. Nei tumori della mammella la stretta interazione recettoriale del GH con la prolattina e funzionale con l'estrogeno, comportano nel contesto di una strategia multiterapica l'inibizione sinergica di GH-GF con somatostatina/octreotide, della prolattina con agonisti dei D2R, ed estrogenica mediante analoghi di FSH-LH e inibitori delle aromatasi, con deciso progresso nella terapia di questi tumori [71-73]. Nei carcinomi mammari monitorati a 5 anni, questa multiterapia biologica sinergicamente potenziata dalle funzioni citostatiche, differenzianti, immunomodulante, trofiche, della Melatonina, Soluzione di retinoidi in vitamina E, Vitamina D3, vitamina C, (Metodo Di Bella), in assenza di rilevante tossicità, ha significativamente migliorato qualità di vita, risposta obiettiva e sopravvivenza rispetto agli stessi stadi delle neoplasie del seno trattate con i protocolli oncologici convenzionali [71-73]. Richiamiamo l'attenzione su questi concetti e su questi dati nell'intento di migliorare la prognosi nelle neoplasie in generale e nel caso specifico dei carcinoma della mammella, che rappresentano ancora oggi, in tutto il mondo, la prima causa assoluta di morte delle donne a dimostrazione delle carenze delle attuali misure terapeutiche e della necessità di superare questi gravi limiti oncologici con la valorizzazione terapeutica di evidenze scientifiche ancora sottovalutate .

BIBLIOGRAFIA

1. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev.* 2001;22(1):53–74.
2. Zhu T, Goh EL, Graichen R, Ling L, Lobie PE. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal.* 2001;13(9):599–616.
3. Goffin V, Bole-Feysot C, Ferrag F, Maaskant R, Vincent V, Weimann E, Kelly PA (1996) Signal transduction of prolactin and cytokine receptors. In: Calvo F, Crepin M, Magdelenat H (eds) *Breast cancer. Advances in biology and therapeutics.* John Libbey Eurotext, London, England, pp 131–137

4. Lincoln DT, El-Hifnawi E (1994) Growth hormone receptor expression in human keratinocytes. *Cell Biol Int* 18:484
5. Lincoln DT., Fred Sinowatz Labiba Temmim-Baker · Hisham I. Baker Sabine Kölle · Michael J. Waters Growth hormone receptor expression in the nucleus and cytoplasm of normal and neoplastic cells. *Histochem Cell Biol* (1998) 109:141–159
6. Baumann G, Stolar MW, Amburn K, Barsano CP, De Vries BC (1986) A specific GH-binding protein in human plasma: initial characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 62:134–141
7. Herington AC, Ymer SI, Stevenson JL (1986) Affinity purification and structural identification of a specific binding protein for human growth hormone in human serum. *Biochem Biophys Res Commun* 139:150–155
8. Edens A, Southard JN, Talamantes F (1994) Mouse GH-binding protein and GH receptor transcripts are produced from a single gene by alternative splicing. *Endocrinology* 135:2802–2805
9. Waters MJ, Spencer SA, Hamlin G, Henzel WJ, Wood WI (1990) Purification and partial sequence of the rabbit mammary gland prolactin receptor. *Int Biochem* 22:1089–1095
10. Lowe W, Roberts C, Lasky S (1987) Differential expression of alternative 5' untranslated regions in RNAs encoding rat insulinlike growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8946–8950
11. Daughaday WH, Trivedy B (1987) Absence of serum growth hormone binding protein in patients with GH receptor deficiency (Laron dwarfism). *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4636–4640
12. Hynes MA, Van Wyk JJ, Brooks PJ, D'Ercole AJ, Lund PK (1987) Growth hormone dependence of somatomedin C-IGF-I and IGF-II mRNA. *Mol Endocrinol* 1:233–242
13. Rabonovitch A, Quigley C, Rechler MM (1983) Growth hormone stimulates islet β -cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. *Diabetes* 32:307–312
14. Kleinberg DL. Early mammary development: growth hormone and IGF-1. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1997;2(1):49–57.
15. Laban C, Bustin SA, Jenkins PJ. The GH-IGF-I axis and breast cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(1):28–34.
16. Conte PF, Gardin G (1990) In vivo manipulation of human breast cancer growth by estrogen and growth hormone: kinetic and clinical results. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:1103–1108

17. Rutter MM, Rose SR. Long-term endocrine sequelae of childhood cancer. *Curr Opin Pediatr.* 2007;19(4):480–7.
18. Neglia JP, Friedman DL, Yasui Y, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, et al. Second malignant neoplasms in five-year survivors of childhood cancer: childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(8):618–29.
19. Ergun-Longmire B, Mertens AC, Mitby P, Qin J, Heller G, Shi W, et al. Growth hormone treatment and risk of second neoplasms in the childhood cancer survivor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3494–8.
20. Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, Occhiogrosso G, Qin J, Heller G, et al. Risk of disease recurrence and second neoplasms in survivors of childhood cancer treated with growth hormone: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(7):3136–41.
21. Artega CL, Osborne CK (1989) Growth inhibition of human breast cancer cells in vitro with an antibody against the type I somatomedinreceptor. *Cancer Res* 49:6237–6241
22. Yee D, Peick S, Lebovic G, Marcus R, Favoni R, Cullen K, Lippman M, Rosen N (1989) Analysis of IGF-I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol Endocrinol* 3:509–517
23. Mertani HC, Garcia-Caballero T, Lambert A, Gerard F, Palayer C, Boutin JM, et al. Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders. *Int J Cancer.* 1998;79(2):202–11.
24. Decouvelaere C, Peyrat JP, Bonnetterre J, Djiane J, Jammes H. Presence of the two growth hormone receptor messenger RNA isoforms in human breast cancer. *Cell Growth Differ.* 1995;6(4):477–83.
25. Huff KK, Kaufman D, Gabbay KH, Spencer EM, Lippman ME, Dickson RB (1986) Secretion of an IGF-I related protein by human breast cancer cells. *Cancer Res* 46:4613–4619
26. Gebre-Medhin M, Kindblom LG, Wennbo H, Tornell J, Meis-Kindblom JM. Growth hormone receptor is expressed in human breast cancer. *Am J Pathol.* 2001;158(4):1217–22.
27. Schally AV, Varga JL. Antagonists of growth hormone-releasing hormone in oncology. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2006;9(3):163–70.
28. Chatzistamou I, Schally AV, Kiaris H, Politi E, Varga J, Kanellis G, et al. Immunohistochemical detection of GHRH and its receptor splice variant 1 in primary human breast cancers. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(3):391–6.

29. Kahan Z, Arencibia JM, Csernus VJ, Groot K, Kineman RD, Robinson WR, et al. Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) messenger ribonucleic acid and the presence of biologically active GHRH in human breast, endometrial, and ovarian cancers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(2):582–9.
30. Gil-Puig C, Seoane S, Blanco M, Macia M, Garcia-Caballero T, Segura C, et al. Pit-1 is expressed in normal and tumorous human breast and regulates GH secretion and cell proliferation. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(2):335–44.
31. Emerald BS, Chen Y, Zhu T, Zhu Z, Lee KO, Gluckman PD, et al. AlphaCP1 mediates stabilization of hTERT mRNA by autocrine human growth hormone. *J Biol Chem.* 2007;282(1):680–90.
32. Dimri G, Band H, Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res.* 2005;7(4):171–9.
33. Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:531–57.
34. Kaulsay KK, Mertani HC, Tornell J, Morel G, Lee KO, Lobie PE. Autocrine stimulation of human mammary carcinoma cell proliferation by human growth hormone. *Exp Cell Res.* 1999;250(1):35–50.
35. Mukhina S, Mertani HC, Guo K, Lee KO, Gluckman PD, Lobie PE. Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(42):15166–71.
36. Murphy L, Bell G, Friesen H (1987) Growth hormone stimulates sequential induction of c-myc and insulin-like growth factor I expression in vivo. *Endocrinology* 120:1806–1812
37. Ward HC, Halliday D, Sim AJW (1987) Protein and energy metabolism with biosynthetic human growth hormone after gastrointestinal surgery. *Ann Surg* 206:56–61
38. Ratner RE, Hare JW (1983) Association of acromegaly and chondrosarcoma. *South Med J* 76:1181–1182
39. Haegg E, Asplun K (1988) Acromegaly and multiple myeloma. *Ann Intern Med* 108:437–438
40. Minuto F, Del Monte P, Barreca A, Fortini P, Cariola G, Catrambone G (1986) Evidence for an increased somatomedin/IGF-I content in primary human lung tumours. *Cancer Res* 46:985–988

41. Adamson U, Brostrom LA, Efendic S (1980) Glucose tolerance, growth hormone and somatomedin levels in osteosarcoma patients. *Acta Endocrinol* 94:517–522
42. Andrew GS (1983) Growth hormone and malignancy. *J Clin Pathol* 36:935–937
43. Swerdlow AJ, Higgins CD, Adlard P, Preece MA. Risk of cancer in patients treated with human pituitary growth hormone in the UK, 1959–85: a cohort study. *Lancet*. 2002;360(9329):273–7.
44. Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, Occhiogrosso G, Qin J, Heller G, et al. Risk of disease recurrence and second neoplasms in survivors of childhood cancer treated with growth hormone: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(7):3136–41.
45. Ron E, Gridley G, Hrubec Z, Page W, Arora S, Fraumeni JF (1991) Acromegaly and gastrointestinal cancer. *68:1673–1677*
46. Ziel FH, Peters AL (1988) Acromegaly and gastrointestinal adenocarcinomas. *Ann Intern Med* 109:514–515
47. Pines A, Rozen P, Ron E, Gilat T (1985) Gastrointestinal tumours in acromegalic patients. *Am J Gastroenterol* 80:266–269
48. Brunner JE, Johnson CC, Zafer S (1990) Colon cancer and polyps in acromegaly: increased risk associated with family history of colon cancer. *Clin Endocrinol* 132:65–71
49. Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1994;31(2–3):325–35.
50. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):442–54.
51. Brunet-Dunand SE, Vouyovitch C et al. “Autocrine human growth hormone promotes tumor angiogenesis in mammary carcinoma” *Endocrinology*, 150(3): 1341-1352, 200
52. Lawler J, Detmar M. Tumor progression: the effects of thrombospondin-1 and - 2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(6):1038–45.
53. Kusano K, Tsutsumi Y, Dean J, Gavin M, Ma H, Silver M, et al. Long-term stable expression of human growth hormone by rAAV promotes myocardial protection post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(2):390–9.
54. Jameel JK, Rao VS, Cawkwell L, Drew PJ. Radioresistance in carcinoma of the breast. *Breast*. 2004;13(6):452–60.

55. Perry JK, Emerald BS, Mertani HC, Lobie PE. The oncogenic potential of growth hormone. *Growth Horm IGF Res.* 2006;16(5–6):277–89.
56. Zhu Z, Mukhina S, Zhu T, Mertani HC, Lee KO, Lobie PE. p44/42 MAP kinase-dependent regulation of catalase by autocrine human growth hormone protects human mammary carcinoma cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene.* 2005;24(23):3774–85.
57. Wu X, Wan M, Li G, Xu Z, Chen C, Liu F, et al. Growth hormone receptor overexpression predicts response of rectal cancers to pre-operative radiotherapy. *Eur J Cancer.* 2006;42(7):888–94.
58. Gallego MI, Binart N, Robinson GW, Okagaki R, Coschigano KT, Perry J, et al. Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Dev Biol.* 2001;229(1):163–75.
59. Vacas E, Muñoz-Moreno L, Growth hormone-releasing hormone induced transactivation of epidermal growth factor receptor in human triple-negative breast cancer cells. *Peptides.* 2016 Dec;86:153-161. doi: 10. 1016/j. peptides. 2016. 11. 004.
60. Brunet-Dunand SE, Vouyovitch C et al. “Autocrine human growth hormone promotes tumor angiogenesis in mammary carcinoma” *Endocrinology*, 150(3): 1341-1352, 2009
61. Jenkins PJ, Mukherjee A, Shalet SM. Does growth hormone cause cancer? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64(2):115–21.
62. Emerman JT, Leahy M, Gout PW, Bruchovsky N. Elevated growth hormone levels in sera from breast cancer patients. *Horm Metab Res.* 1985;17(8):421–4.
63. Yakar S, Leroith D, Brodt P. The role of the growth hormone/insulin-like growth factor axis in tumor growth and progression: Lessons from animal models. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(4–5):407–20.
64. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev.* 2000;21(3):215–44.
65. Hughes JP, Friesen HG (1985) The nature and regulation of the receptors for pituitary growth hormone. *Annu Rev Physiol* 47:469–482
66. Lesniak MA, Hedo JA, Grunberger G, Marcus-Samual B, Roth J, Gordan P (1985) Receptors for insulin and growth hormone on lymphoid cells. *Methods Enzymol* 150:701
67. Kozak RW, Haskell JF, Greenstein L, Rechler M, Waldman T, Nissley S (1987) Type I and II IGF receptors in human phytohe- 158 magglutinin activated T-lymphocytes. *Cell Immunol* 109:318– 331

68. El Etreby MF, Mahrous AI (1979) Immunocytochemical technique for detection of prolactin (PRL) and growth hormone (GH) in hyperplastic and neoplastic lesions of dog prostate and mammary gland. *Histochemistry* 64:279–286
69. Sinowatz F, Breipohl W, Waters MJ, Lincoln DT, Lobie P, Amselgruber W (1991) GH receptor expression in the Dunning R 3327 prostatic carcinoma of the rat. *Prostate* 19:273–278
70. Bengtsson BA, Eden S, Ernest I, Oden A, Sjogren B (1988) Epidemiology and long-term survival in acromegaly. *Acta Med Scand* 223:327–335
71. Di Bella G, Mascia F, Ricchi A, Colori B. Evaluation of the safety and efficacy of the first-line treatment with somatostatin combined with melatonin, retinoids, vitamin D3, and low doses of cyclophosphamide in 20 cases of breast cancer: a preliminary report. *Neuroendocrinology Letters* Volume 34 No. 7 2013
72. Di Bella G. Complete objective response to biological therapy of plurifocal breast carcinoma *Neuroendocrinology Letters* Volume 29 No. 6 2008
73. Di Bella G. The Di Bella Method (DBM) improved survival, objective response and performance status in a retrospective observational clinical study on 122 cases of breast cancer. *Neuroendocrinology Letters* Volume 32 No. 6 2011.
74. Di Bella G, Toscano R, Ricchi A, Colori B. Congenital fibrosarcoma in complete remission with Somatostatin, Bromocriptine, Retinoids, Vitamin D3, Vitamin E, Vitamin C, Melatonin, Calcium, Chondroitin sulfate associated with low doses of Cyclophosphamide in a 14-year Follow Up. Case Report. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016 Jan 27;36(8):725-733.
75. Di Bella G, Leci J, Ricchi A, Toscano R. Recurrent Glioblastoma Multiforme (grade IV - WHO 2007): a case of complete objective response - concomitant administration of Somatostatin / Octreotide, Retinoids, Vit E, Vit D3, Vit C, Melatonin, D2 R agonists (Di Bella Method. *Neuro Endocrinol Lett.* 2015;36(2):127-32.
76. Di Bella G, Colori B. Complete objective response of neuroblastoma to biological treatment. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009;30(4):437-49.
77. Di Bella G, Colori B (2012). The Di Bella Method (DBM) improved survival, objective response and performance status in a retrospective observational clinical study on 23 tumours of the head and neck. *Neuro Endocrinol Lett.* 33(3): 249–56.
78. Di Bella G, Madarena M. Complete objective response of oesophageal squamocellular carcinoma to biological treatment. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009;30(3):312-21.

79. Norsa A, Martino V (2006). Somatostatin, retinoids, melatonin, vitamin D, bromocriptine, and cyclophosphamide in advanced non-small-cell lung cancer patients with low performance status. *Cancer Biother Radiopharm.* 21(1): 68–73.
80. Di Bella G, Colori B, Mascia F (2012). The Di Bella Method (DBM) improved survival, objective response and performance status in a retrospective observational clinical study on 55 cases of lymphomas. *Neuro Endocrinol Lett.* 33(8): 773–81.
81. Todisco M (2009). Chronic lymphocytic leukemia: long-lasting remission with combination of cyclophosphamide, somatostatin, bromocriptine, retinoids, melatonin, and ACTH. *Cancer Biother Radiopharm.* 24(3): 353–5.
82. Todisco M, Casaccia P, Rossi N (2001). Cyclophosphamide plus somatostatin, bromocriptin, retinoids, melatonin and ACTH in the treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphomas at advanced stage: results of a phase II trial. *Cancer Biother Radiopharm.* 16(2): 171–7.
83. Wu ZS, Yang K, Wan Y, Qian PX, Perry JK, Chiesa J, Mertani HC, Zhu T, Lobie PE. Tumor expression of human growth hormone and human prolactin predict a worse survival outcome in patients with mammary or endometrial carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Oct;96(10):E1619-29.
84. Perry JK¹, Mohankumar KM, Emerald BS, Mertani HC, Lobie PE. The contribution of growth hormone to mammary neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008 Mar;13(1):131-45.

