

Università degli Studi di Bologna

FACOLTÀ DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Area 06 MED/09

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA APPLICA

XIX CICLO

COORDINATORE PROF. CARLO FRANZINI

Valutazione quantitativa dei recettori della somatostatina in tumori neuroendocrini e loro valutazione funzionale mediante nuovi analoghi della somatostatina in modelli cellulari

Relatore:

Prof. Mauro Bernardi

Candidata:

Dr.ssa Federica Tomassoni

Correlatore:

Dr. Uberto Pagotto

Anno Accademico 2005-2006

In collaborazione con:

Dott.ssa Marily Theodoropoulou
Department of Endocrinology
Max Planck Institute of Psychiatry
Monaco
Germania

e

Dott. Davide Campana
Dip. Medicina Interna e Gastroenterologia
Azienda Ospedaliero - Universitaria
S. Orsola Malpighi
Bologna

INDICE

INTRODUZIONE

GENERALITA' SUI TUMORI NEUROENDOCRINI

TUMORI GASTRO-ENTERO-PANCREATICI

<u>TUMORE ENDOCRINO DELLO STOMACO</u>	7
<u>TIPO 1</u>	8
<u>TIPO 2</u>	9
<u>TIPO 3</u>	10
<u>TUMORE ENDOCRINO DEL DUODENO-DIGIUNO PROSSIMALE</u>	10
<u>TUMORI ENDOCRINI DEL DIGIUNO-ILEO-CIECO</u>	11
<u>TUMORI ENDOCRINI DEL PANCREAS</u>	12
<u>INSULINOMA</u>	12
<u>GASTRINOMA</u>	13
<u>VIPOMA (SINDROME DI VERNER-MORRISON)</u>	13
<u>SOMATOSTATINOMA</u>	14
<u>NEOPLASIA ENDOCRINA MULTIPLA DI TIPO 1</u>	15

ADENOMI IPOFISARI

<u>ADENOMI IPOFISARI SECERNENTI</u>	18
<u>GH-SECERNENTI</u>	18
<u>ACTH-SECERNENTI</u>	18
<u>ADENOMI NON SECERNENTI</u>	18

LA SOMATOSTATINA ED I SUOI ANALOGHI LONG-ACTING 21

I RECETTORI DELLA SOMATOSTATINA

NUOVI SVILUPPI NELLA FISILOGIA DEGLI SSTRS 25

MATERIALI E METODI

<u>CAMPIONAMENTO E STOCCAGGIO DEI TESSUTI</u>	29
<u>TUMORI GASTRO-ENTERO-PANCREATICI</u>	29
<u>ADENOMI IPOFISARI</u>	31

<u>COLTURE CELLULARI</u>	33
<u>ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA</u>	35
<u>ESTRAZIONE DELL’RNA DA TESSUTO</u>	35
<u>RETROTRASCRIZIONE DELL’RNA</u>	36
<u>REAL TIME PCR</u>	37
<u>PROGETTAZIONE DEI PRIMERS</u>	41
<u>REAZIONE DI PCR</u>	43
<u>ANALISI STATISTICA</u>	44
<u>ANALISI MOLECOLARE DEL DNA GENOMICO</u>	45
<u>TUMORI</u>	45
<u>ESTRAZIONE DEL DNA DA TESSUTO</u>	45
<u>AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR</u>	47
<u>DHPLC</u>	48
<u>ANALISI IN DHPLC</u>	52
<u>SEQUENZIAMENTO FRAMMENTI POLIMORFICI</u>	54
<u>RISULTATI ADENOMI IPOFISARI</u>	
<u>ESPRESSIONE DEI RECETTORI DELLA SOMATOSTATINA</u>	57
<u>EFFETTO DI SOM230 VS. OCTREOTIDE SULLA SECREZIONE ORMONALE</u>	60
<u>EFFETTO DI SOM230 VS. OCTREOTIDE SULLA VITALITA’ CELLULARE</u>	62
<u>CONFRONTO TRA L’ESPRESSIONE DI SSTR E L’EFFETTO DI SOM230 E DI OCTREOTIDE</u>	65
<u>ANALISI MOLECOLARE DEL DNA GENOMICO</u>	66

RISULTATI TUMORI GASTRO-ENTERO-PANCREATICI **71**

DISCUSSIONE

PUBBLICAZIONI

BIBLIOGRAFIA

RINGRAZIAMENTI

INTRODUZIONE

I tumori neuroendocrini sono neoplasie relativamente rare, che insorgono a carico del sistema neuroendocrino, un sistema di cellule diffuso in tutto l'organismo, le quali hanno la capacità di secernere i loro prodotti in maniera controllata in risposta ad uno specifico stimolo. Il termine neuroendocrino si riferisce quindi al tipo di cellula dal quale questi tumori originano piuttosto che alla sede di origine. Questi tumori possono svilupparsi in tutte le parti dell'organismo e rappresentano quindi un gruppo eterogeneo di neoplasie con un comportamento intermedio tra le due categorie di tumori benigni e maligni.

Nel nostro studio verranno prese in considerazione solo parte di questo gruppo eterogeneo di neoplasie. La scelta è eminentemente dovuta al fatto che l'Unità Operativa di Endocrinologia ha già in atto una serie di collaborazioni con alcune strutture presso le quali si dirigono pazienti affetti da carcinoidi, tumori gastro-entero-pancreatici secernenti e non secernenti (come insulinoma, gastrinoma e VIPoma e masse gastro-entero-pancreatiche silenti), adenomi ipofisari.

Il trattamento proposto per questo tipo di tumori è molto frequentemente l'asportazione chirurgica, ma sia per l'alto numero di recidive, sia per la talora impossibilità della completa rimozione chirurgica, molto spesso al trattamento chirurgico viene affiancato il trattamento con gli analoghi della somatostatina (SST).

Il razionale per l'uso degli analoghi della SST nel trattamento dei tumori neuroendocrini è rappresentato dalle proprietà di tale neuropeptide quali la sua attività antiproliferativa ed il suo effetto inibitorio sulla secrezione, qualora sia presente nelle forme secernenti. Inoltre la SST ed i suoi analoghi trovano uno scopo nella terapia farmacologica, poiché le cellule tumorali sono state viste esprimere, seppure con un quadro estremamente disomogeneo, recettori (SSTR1, 2, 3, 4 e 5) in grado di legare la SST e i suoi derivati farmacologici.

Gli adenomi ipofisari, come pure i carcinoidi e le neoplasie del tratto gastrointestinale a carattere neuroendocrino, hanno un'ampia distribuzione degli SSTR ed esprimono di solito più di un tipo recettoriale. Gli studi maggiori si sono concentrati sugli adenomi ipofisari, ma gran parte di questi hanno impiegato tecniche non quantitative.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare, in prelievi bioptici di carcinoidi, neoplasie neuroendocrine del tratto gastro-entero-pancreatico silenti, secernenti, adenomi ipofisari, il pattern espressivo quantitativo dell'RNA messaggero che codifica per gli SSTR, per la predizione biomolecolare dell'efficacia terapeutica dei farmaci di nuova generazione.

Recentemente è stato disegnato un nuovo analogo della SST (SOM230)¹ esapeptide stabile che lega 4 su 5 recettori della somatostatina (SSTR1, 2, 3 e 5), e quando confrontato al farmaco di largo uso nella pratica terapeutica per il trattamento degli adenomi ipofisari, octreotide, ha mostrato un'affinità minore per SSTR2 ma un'affinità maggiore per SSTR5 1.

Nel presente studio abbiamo analizzato, in colture cellulari primarie ottenute dalle biopsie di adenomi ipofisari, l'effetto di inibizione sulla secrezione ormonale e l'azione antiproliferativa del nuovo analogo universale SOM230 e l'abbiamo messo a confronto con l'effetto antisecretorio ed antiproliferativo di octreotide. La responsività in vitro agli analoghi della SST è stata poi messa a confronto con il pattern di espressione dei sottotipi recettoriali.

In ultimo sono stati selezionati i campioni che esprimono i recettori della SST specifici per gli analoghi utilizzati, ma resistenti al trattamento con essi, ed è stata effettuata su questi campioni un'analisi molecolare del DNA genomico per mezzo di ricerca di mutazione con DHPLC e sequenziamento.

Abbiamo quindi messo a punto una metodica D-HPLC per la ricerca dei polimorfismi e delle mutazioni di SSTR, per verificare l'ipotesi di una associazione tra i diversi polimorfismi e la resistenza agli analoghi della SST.

Sembra infatti che alcune mutazioni siano in grado di bloccare l'azione antiproliferativa della SST e di attivare il pathway mitogenico in pazienti resistenti all'analogo octreotide².

GENERALITA' SUI TUMORI NEUROENDOCRINI

I tumori neuroendocrini sono costituiti da cellule proprie sia del sistema endocrino che del sistema nervoso. In linea generale il termine “neuroendocrino” è utilizzato per definire un sistema di cellule diffuso in tutto l’organismo, le quali hanno la capacità di secernere i loro prodotti in maniera controllata in risposta ad uno specifico stimolo. I criteri che sono oggi giorno accettati per definire le cellule neuroendocrine sono i seguenti: la produzione di un neurotrasmettitore, neuromodulatore o neuropeptide ormonale; la presenza di granuli secretori dai quali viene rilasciato per esocitosi l’ormone in risposta ad uno stimolo esterno; l’assenza di assoni e sinapsi.

La classificazione dei tumori neuroendocrini secondo il WHO (World Health Organization) è morfofunzionale e si basa principalmente su caratteristiche microscopiche, ma anche su dati ottenuti dall’immunoistochimica (con marker come la cromogranina), dall’impregnazione argentea e dalle metodiche di immunoistochimica per specifici ormoni.

I tumori neuroendocrini sono un gruppo molto eterogeneo di neoplasie che derivano da cellule ad origine neuroendocrina. Come sopra menzionato verranno prese in considerazione solo parte di questo gruppo di tumori ed in particolare tumori gastro-entero-pancreatici secernenti e non secernenti e adenomi ipofisari.

TUMORI GASTRO-ENTERO-PANCREATICI

I tumori endocrini del tratto gastro-entero-pancreatico vengono clinicamente classificati in rapporto alla sede della neoplasia ed alla presenza o meno di sindrome associata. In particolare le neoplasie endocrine prese in considerazione sono:

1. *Tumori endocrini gastro-intestinali associati o meno a sindrome da carcinoide di*

- STOMACO
- DUODENO-DIGIUNO PROSSIMALE
- DIGIUNO DISTALE-ILEO-CIECO

2. *Tumori endocrini del pancreas*

- INSULINOMA
- GASTRINOMA
- VIPOMA (SINDROME DI VERNER-MORRISON)
- CARCINOIDI NON ASSOCIATI A SINDROME

In generale queste neoplasie si possono anche suddividere tra forme ben differenziate e forme scarsamente differenziate. Le forme ben differenziate presentano sovente lunghe sopravvivenze anche in presenza di metastasi epatiche. Il loro trattamento di regola non beneficia della chemioterapia, a causa del basso indice proliferativo, mentre gli analoghi della SST e l'interferone possono essere efficaci. La terapia chirurgica può trovare applicazione anche con approccio citoriduttivo. Per contro, le forme poco differenziate hanno prognosi rapidamente infausta, possono beneficiare solo del trattamento chemioterapico e la chirurgia è indicata soltanto in condizioni di radicalità, evenienza che di solito non si verifica a causa dello stadio della neoplasia all'atto della diagnosi.

TUMORE ENDOCRINO DELLO STOMACO

Il tumore endocrino dello stomaco origina dalle cellule ECL presenti a livello della mucosa gastrica e costituisce circa il 6% dei tumori endocrini del tratto gastro-intestinale (chiamati fino al 2000 carcinoidi del tratto gastro-intestinale)³.

Negli ultimi anni si è assistito ad un notevole aumento nella diagnosi di tali neoplasie ³. Tale incremento è verosimilmente da attribuire ad un maggiore utilizzo di procedure endoscopiche del tratto esofago-gastro-duodenale, ad un più frequente ricorso alla biopsia della mucosa gastrica e ad un maggiore ricorso, da parte dell'anatomo patologo, di specifiche tecniche di diagnosi immunoistochimica.

Sulla base del tipo di patologia gastrica associata i tumori endocrini dello stomaco si suddividono in ⁴:

- *TIPO 1* o tumore associato a gastrite cronica atrofica (GCA);
- *TIPO 2* o tumore associato a Sindrome di Zollinger-Ellison in paziente con Neoplasia Endocrina Multipla di tipo 1 (ZES-MEN 1);
- *TIPO 3* o sporadico.

TIPO 1

Il tumore endocrino dello stomaco associato a gastrite cronica atrofica rappresenta la forma più frequente di neoplasia endocrina dello stomaco. Si tratta generalmente di lesioni multiple, di dimensioni inferiori a 1-2 cm, localizzate a livello della mucosa del corpo-fondo dello stomaco. Originano dalle cellule ECL dello stomaco secondo un progressivo passaggio partendo dalla semplice iperplasia, attraverso la displasia fino alla neoplasia vera e propria; presentano una crescita estremamente lenta e generalmente non determinano metastasi a distanza ⁵. Tale neoplasia risulta essere strettamente correlata alla gastrite cronica atrofica conseguente ad una patologia autoimmune (gastrite cronica atrofica di tipo A con positività degli anticorpi anti cellule parietali gastriche associata o meno ad anemia perniziosa) o sviluppatasi in seguito ad una infezione cronica da *Helicobacter Pylori*. Infatti l'atrofia gastrica è in grado di stimolare una iperсекреzione di gastrina che, tramite il suo effetto trofico sulle cellule ECL dello stomaco, rappresenta lo stimolo primario allo

sviluppo della iperplasia-displasia-neoplasia endocrina dello stomaco. I tumori di tipo 1 sono frequentemente multipli e le metastasi linfonodali sono infrequenti. Dal punto di vista clinico questi tumori sono sempre non funzionanti.

TIPO 2

I tumori a cellule ECL di tipo 2 sono rari, costituiscono appena il 6% di una larga serie recentemente studiata 5. Tali tumori generalmente insorgono in pazienti adulti senza prevalenza di sesso. Gli ECL-omi gastrici sono riportati nel 13-30% dei pazienti con ZES-MEN 1, nello 0-0.6% dei pazienti senza MEN 1 e, in una recente pubblicazione, Jensen ha sostenuto che il 37% dei pazienti affetti da MEN 1 sviluppa carcinoidi gastrici ^{6 7}. Queste osservazioni suggeriscono che, nella ZES, l'ipergastrinemia non è sufficiente a provocare iperplasia delle cellule ECL, ma di solito altri fattori genetici sono necessari alla carcinoidogenesi. Sebbene non sia chiaro quali siano questi fattori, uno di essi potrebbe essere un fattore di crescita circolante, come quello che stimola l'iperplasia delle paratiroidi nei pazienti con MEN 1 ⁸.

I tumori a cellule ECL nella MEN 1 sono spesso multicentrici, con assenza istologica di mitosi numerose; sono di dimensioni comprese tra pochi millimetri e 1.5 cm, e sono delimitati da mucosa e sottomucosa 5.

Metastasi ai linfonodi locali si possono osservare nel 30% dei casi circa e metastasi a distanza in circa il 10% dei pazienti 3. Nonostante questo la sopravvivenza dei pazienti è generalmente eccellente anche in presenza di metastasi⁹. Recentemente sono stati descritti da Bordi et al. carcinoidi gastrici di tipo 2 insolitamente aggressivi in due pazienti con MEN 1¹⁰.

TIPO 3

I tumori endocrini dello stomaco di tipo 3 o sporadici si sviluppano generalmente a livello dell'antro gastrico, sono singoli, di dimensioni variabili tra 2 e 5 cm, non si associano ad ipergastrinemia e presentano generalmente un comportamento aggressivo con metastasi a distanza in circa il 50% dei casi 3 5. Nel 30-50% dei pazienti è presente la sindrome da carcinoide "atipica" caratterizzata da flush cutaneo di lunga durata, di tonalità purpurea associato a vasodilatazione ed edema del collo che fanno assumere al volto l'aspetto della "leonine face". Altri sintomi associati sono: ipotensione, scialorrea, sudorazione, lacrimazione, rinorrea e reazione orticarioide pruriginosa.

I carcinomi endocrini dello stomaco appena descritti sono tumori endocrini differenziati. Ne esiste anche un tipo scarsamente differenziato (noto come carcinoide di *TIPO 4*), entità molto rara, caratterizzato da un comportamento maligno e prognosi particolarmente negativa.

TUMORE ENDOCRINO DEL DUODENO-DIGIUNO PROSSIMALE

I tumori endocrini del duodeno rappresentano circa il 6.3% dei tumori endocrini del tratto gastro-intestinale, presentano una maggiore incidenza nel sesso maschile e l'età media alla diagnosi è di circa 66 anni 3 11. Il riscontro è generalmente occasionale a seguito di una esofago-gastro-duodenoscopia eseguita per screening (15% dei casi) o per una sintomatologia aspecifica quale dispepsia (41% dei casi circa) o dolore addominale (48% dei pazienti). Più raramente la patologia si può manifestare con vomito, calo ponderale, emorragia digestiva o pancreatite acuta 11. La sindrome da carcinoide è rara e presente unicamente nei pazienti con malattia metastatica 11.

Generalmente i tumori endocrini del duodeno sono di piccole dimensioni e vengono trattati con la semplice escissione endoscopica. Nel caso in cui le dimensioni siano superiori al centimetro o la lesione si sia sviluppata in regione periampollare può essere necessario un approccio chirurgico tramite escissione transduodenale o cefalo-duodeno-pancreasectomia 11.

TUMORI ENDOCRINI DEL DIGIUNO-ILEO-CIECO

I tumori endocrini dell'ileo rappresentano la forma più frequente di neoplasia endocrina del tratto gastro-intestinale; l'età media alla diagnosi è di 66 anni e l'incidenza è lievemente maggiore nel sesso maschile 3¹². Essi sono composti da cellule enterocromaffini (EC) produttori di serotonina e sostanza P. Tumori di dimensioni inferiori a 1 cm, non infiltranti la tonaca muscolare, hanno comportamento benigno, ma sono di solito riscontrati solo al tavolo autoptico, essendo totalmente asintomatici. Quelli diagnosticati in vivo sono, invece, di dimensioni superiori al centimetro, sono multipli nel 40% dei casi ed infiltrano a tutto spessore la tonaca muscolare. Per effetto della produzione tumorale di fattori di crescita, la parete muscolare infiltrata dal tumore appare ipertrofica e la proliferazione fibroblastica nella sottosierosa adiacente può indurre fenomeni di retrazione ed inginocchiamento dell'ansa intestinale coinvolta che possono produrre occlusione intestinale¹³.

La patologia si può manifestare o con sintomi da massa neoplastica quale l'occlusione intestinale o con la classica sindrome da carcinoide. In quest'ultimo caso la produzione di amine biogene quali serotonina, idrossitriptamina, kalicreina e tachichinine determina lo sviluppo di una sintomatologia generalmente caratterizzata da flushing cutaneo (di colore da rosa chiaro a rosso, localizzato sul volto fino alla linea dei capezzoli, di breve durata e spesso scatenato da particolari alimenti), diarrea, broncospasmo e insufficienza

tricuspidalica con fibrosi del cuore destro ¹⁴. Non di rado la diagnosi di tumore endocrino dell'ileo viene posta a seguito del riscontro occasionale, in corso di ecotomografia addominale, di metastasi epatiche multiple con lesione primitiva a sede ignota. In questi casi il ricorso a procedure diagnostiche quali la biopsia ecoguidata permette una valida caratterizzazione delle lesioni epatiche ed una corretta diagnosi.

TUMORI ENDOCRINI DEL PANCREAS

INSULINOMA

L'insulinoma è il più comune tra i tumori funzionanti del pancreas, prevale nel sesso maschile, in età compresa tra 30 e 60 anni ed ha generalmente un comportamento benigno ¹⁵. Nel 70-80% dei casi il tumore si presenta come nodulo solitario, talvolta può avere multiple localizzazioni. Nella maggior parte dei casi si localizza nel pancreas, anche se insulinomi aberranti, sono stati ritrovati nel duodeno, nell'ileo, nel polmone e nella cervice uterina. E' caratterizzato da una prevalente ed inappropriata secrezione di insulina che determina una sindrome caratterizzata da ipoglicemia (100%), sintomi neuroglicopenici (80-100%) e sintomi da stimolazione adrenergica (80-100%).

Si manifesta generalmente con sintomi subdoli quali fame, astenia, nausea, vomito, parestesie, neuropatie periferiche e visione offuscata. Tali sintomi sono in parte mascherati dalla tendenza di questi pazienti a compensare l'ipoglicemia con l'iperalimentazione; spesso quindi tali pazienti sono in soprappeso. I sintomi più drammatici dell'ipoglicemia quali le manifestazioni neuropsichiatriche oscillanti da moderati cambiamenti della personalità alla confusione mentale e al coma possono creare difficoltà nella diagnosi.

GASTRINOMA

Il gastrinoma, tumore a prevalente secrezione di gastrina è responsabile della sindrome di Zollinger-Ellison (ZES) caratterizzata da malattia ulcerosa, ipersecrezione acida e/o diarrea ¹⁶. La sede prevalente del gastrinoma è il duodeno (76%) seguito dal pancreas (24%) ¹⁷. Sono stati descritti inoltre in letteratura gastrinomi nello stomaco, nell'intestino tenue e a livello linfonodale ¹⁸. Il gastrinoma è, nella maggior parte dei casi (70%), di piccole dimensioni e frequentemente multifocale, e per tale motivo, spesso non viene diagnosticato né con le comuni metodiche di imaging, né al tavolo operatorio. Le sedi più frequenti di metastatizzazione sono i linfonodi regionali (60%) e il fegato. Il gastrinoma determina frequentemente una malattia peptica (84-92%), per cui ogni lesione ulcerosa dovrebbe far nascere il sospetto di ZES. La diarrea può precedere, accompagnare o seguire l'ulcera; è permanente nel 25% dei casi, intermittente nel restante 75%. Il numero delle evacuazioni giornaliere può variare da 2-3 a più di 10, le feci sono chiare, acquose, untuose per la presenza di steatorrea. La diarrea è sempre associata ad ipergastrinemia e ipersecrezione acida, quindi facilmente distinguibile dalla diarrea della sindrome di Verner-Morrison da vipoma che costantemente è associata ad ipocloridria ¹⁹.

VIPOMA (SINDROME DI VERNER-MORRISON)

I termini vipoma, sindrome di Verner-Morrison (SVM), WDHA, rappresentano le denominazioni di un'affezione caratterizzata dalla presenza di un tumore endocrino a prevalente secrezione di VIP (Vaso Intestinal Polipeptide), caratterizzata da diarrea acquosa, ipokaliemia ed ipocloridria, in assenza di ipersecrezione acida e di ulcera peptica ²⁰. Il sesso femminile sembra colpito con una frequenza tripla rispetto a quello maschile e la maggior parte delle osservazioni riguarda soggetti di età compresa fra i 17 e i 72 anni. Le neoplasie

che si associano alla SVM sono per lo più di origine pancreatica, sebbene sempre più spesso vengano diagnosticati tumori di origine nervosa come ganglioneuromi, neuroblastomi e feocromocitomi che secernono VIP. La sindrome di Verner-Morrison è caratterizzata da crisi diarroiche coleriformi con notevole perdita di acqua ed elettroliti, con conseguente ipopotassiemia, dimagrimento e disidratazione. Si associano inoltre intolleranza glucidica di tipo diabetico, ipercalcemia, ipomagnesemia, ipotensione e crisi di “flushing” cutaneo.

SOMATOSTATINOMA

Il somatostatinoma è un raro tumore a prevalente secrezione di somatostatina, più frequente nel sesso femminile ed è localizzato nel duodeno (57%) e nel pancreas (43%)²¹. L'età media alla diagnosi è circa 53 anni, range 26-84. Le dimensioni variano da 2-3 cm per quelli duodenali a 5-6 cm per quelli pancreatici. Tra tutti i tumori neuroendocrini funzionanti del pancreas il somatostatinoma è sicuramente quello che ha una presentazione clinica più subdola poiché la sindrome è costituita da sintomi generici e di lieve entità. La classica sindrome è caratterizzata da litiasi della colecisti, diabete e diarrea con steatorrea²². Il somatostatinoma duodenale può costituire un reperto accidentale nel corso di un esame endoscopico; si associa a sintomi e segni da ostruzione al deflusso bilio-pancreatico quando è localizzato nell'ampolla di Vater, oppure, talvolta con emorragia digestiva dovuta ad ulcerazione. I somatostatinomi duodenali si associano frequentemente a neurofibromatosi di tipo I. Eccezionalmente il somatostatinoma si presenta nell'ambito della MEN 1.

NEOPLASIA ENDOCRINA MULTIPLA DI TIPO 1

La neoplasia endocrina multipla di tipo 1 o sindrome di Wermer è caratterizzata dall'associazione di iperparatiroidismo, iperplasia e/o tumori funzionanti o non funzionanti dell'ipofisi e tumori endocrini del tratto gastroenteropancreatico. Accanto alle suddette lesioni possono coesistere altre manifestazioni, peraltro meno comuni, come ad esempio i lipomi sottocutanei o viscerali, tumori delle ghiandole surrenali, della tiroide, carcinoidi bronchiali, timici e intestinali. La sindrome di Wermer è frequentemente di tipo familiare e solo occasionalmente ha una estrinsecazione sporadica. I casi familiari sono trasmessi con carattere autosomico dominante, con penetranza incompleta ed espressività variabile. La reale incidenza della MEN 1 è sconosciuta, sebbene questa malattia sia meno rara di quanto comunemente si creda. Studi effettuati post-mortem hanno dimostrato che la prevalenza è dello 0.25% fra tutte le neoplasie osservate. La sindrome, che può colpire tutti i gruppi di età, viene generalmente diagnosticata nella quarta decade di vita. La prima manifestazione della malattia è usualmente secondaria all'iperfunzione delle paratiroidi (90-97%); in seguito diventa evidente l'iperfunzione delle altre ghiandole, realizzandosi così il quadro clinico completo ²³. Per quanto riguarda i tumori del pancreas questi sono presenti nel 30-75% dei casi, mentre i tumori ipofisari nel 15-20%. I tumori endocrini nella MEN 1 sono caratteristicamente multicentrici e composti da differenti stadi di proliferazione cellulare: nesidioblastosi, microadenoma, carcinoma. Tale popolazione cellulare esprime vari tipi di peptidi: polipeptide pancreatico (PP), glucagone, insulina, somatostatina, gastrina polipeptide intestinale vasoattivo (VIP) e neurotensina, in ordine di frequenza ²⁴. La malignità di questi tumori è indicata dalla comparsa di metastasi in circa il 50% dei pazienti; generalmente i tumori endocrini del pancreas nell'ambito della MEN 1 sono caratteristicamente meno aggressivi di quelli sporadici. Le neoplasie pancreatiche più comunemente

osservate sono di tipo non funzionante, seguono quelle a secrezione di gastrina e di insulina che danno rispettivamente la sindrome di Zollinger Ellison e la sindrome da ipoglicemia. E' oramai ampiamente dimostrato che nella MEN 1 la sindrome di Zollinger-Ellison è determinata da gastrinomi localizzati nel duodeno.

ADENOMI IPOFISARI

Si tratta di un tumori benigni, a lenta crescita, originanti da una porzione della ghiandola ipofisaria. La maggior parte degli adenomi ipofisari cresce nei due terzi anteriori della ghiandola (adenoipofisi).

Gli adenomi vengono classificati in base alla secrezione in secernenti e non secernenti o non funzionanti (la maggioranza sono secernenti e vengono ulteriormente classificati in base all'ormone secreto) ed in base alle dimensioni in microadenomi (< 10 mm) e macroadenomi (tra 10 mm e 20 mm). In generale, esiste una buona correlazione tra l'attività secretoria in vivo e il reperto morfologico di positività per lo stesso ormone valutata mediante tecniche immunoistochimiche in microscopia ottica ed elettronica ²⁵. Va tuttavia segnalato che negli ultimi anni è stato possibile chiarire che la grande maggioranza degli adenomi non-secernenti o non-funzionanti in realtà è in grado di sintetizzare glicoproteine ed in particolare la subunità alfa comune agli ormoni glicoproteici e le subunità beta dell'LH, dell' FSH e più raramente del TSH.

Nel 25% dei casi gli adenomi si sviluppano in pazienti con neoplasie endocrine multiple tipo I. Rappresentano circa il 15% di tutti i tumori primitivi intracranici. In realtà sono ben più numerosi, senza però estrinsecarsi clinicamente. Possono presentarsi a qualsiasi età, ma sono rari prima della pubertà. La maggior parte dei tumori rimane silente. In alcuni casi comunque il progressivo aumento determina importanti problemi ormonali e neurologici.

Gli adenomi ipofisari hanno una varietà di manifestazioni cliniche dovute ai disturbi endocrinologici e/o all'effetto massa.

Come già accennato, classicamente, gli adenomi si distinguono in due gruppi: secernenti e non secernenti (o non funzionanti). Qui di seguito sono riportate le caratteristiche solo di alcune tipologie di adenomi ipofisari prese in considerazione nel nostro studio.

ADENOMI IPOFISARI SECERNENTI

GH-SECERNENTI

Gli adenomi ipofisari GH secernenti rappresentano circa il 20-25% degli adenomi ipofisari e sono nella maggior parte dei casi dei macroadenomi (70-80%). Elevati livelli dell'ormone della crescita (GH) e del fattore di crescita GH-dipendente (IGF-1) provocano gigantismo nei bambini (evenienza molto rara) ed acromegalia negli adulti (vengono infatti definiti acromegalici o ACRO). L'acromegalia si può manifestare con: aumento di volume delle mani e dei piedi, aumento di peso, prognatismo, macroglossia, iperidrosi, ipertensione arteriosa, cefalea, dolori articolari, cardiomiopatia acromegalica.

ACTH-SECERNENTI

Circa l'8-10% degli adenomi ipofisari è rappresentato da quelli ACTH secernenti, che sono nella maggior parte dei casi dei microadenomi (< 5 mm). Nella malattia di Cushing è presente un'iperattività dell'ormone corticotropo con ipersecrezione di ACTH e Cortisolo (identificati nel nostro studio come CUSH). Clinicamente si possono manifestare con: ipertensione, diabete-ipopotassiemia, obesità, strie rubre, debolezza muscolare, ecchimosi, amenorrea, iperandrogenismo, osteoporosi, ulcera peptica e turbe psichiatriche. Sono più frequenti nelle donne adulte.

ADENOMI NON SECERNENTI

Gli adenomi non secernenti o non funzionanti (Non Functionary Pituitary Adenomas o NFPA), si manifestano per l'effetto massa sulle strutture circostanti. Pertanto si tratta molto spesso di macroadenomi.

- *Compressione su chiasma ottico*: calo del visus e riduzione del campo visivo (es. emianopsia bitemporale);
- *Compressione sulla ghiandola ipofisaria*: svariati segni di ipopituitarismo (ipotiroidismo, ipoadrenalismo che si manifesta con facile stancabilità ed ipotensione ortostatica, ipogonadismo che provoca amenorrea, calo della libido, infertilità e raramente diabete insipido);
- *Compressione sul seno cavernoso*: interessamento dei nervi cranici (III, IV, V1, V2, VI): dolore facciale, diplopia.

Per un completo inquadramento del paziente con adenoma ipofisario risulta fondamentale un lavoro di equipe che comprende: il neurochirurgo per l'indicazione all'intervento e per l'atto chirurgico, l'endocrinologo per l'inquadramento clinico generale, la valutazione della patologia specifica e la gestione complessiva dell'utente nelle varie fasi diagnostiche e terapeutiche (mediche e chirurgiche), il neuroradiologo per il neuroimaging (RMN cerebrale diagnostica e RMN cerebrale di controllo solitamente a 4 mesi dall'intervento) e l'anatomo-patologo per il quadro istologico della lesione asportata.

Il fine della terapia medica di queste lesioni è di ridurre i livelli ormonali eccessivi associati con gli adenomi secernenti, e, in alcuni casi, la riduzione delle dimensioni tumorali. La terapia medica degli adenomi ipofisari si avvale di neurofarmaci e di analoghi a lunga durata di neuroormoni inibitori (tra questi gli analoghi della SST), che oltre ad essere efficaci sugli stati ipersecretivi, permettono talvolta di ridurre il volume dell'adenoma stesso. Il trattamento medico può essere l'approccio di prima scelta oppure può essere di supporto alla terapia chirurgica quando questa non è definitiva.

Un cenno sugli aspetti eziopatogenetici degli adenomi ipofisari. Per anni si è dibattuto se gli adenomi ipofisari rappresentino una lesione primitiva dell'ipofisi o siano imputabili ad una disfunzione ipotalamica in grado di indurre, attraverso un ridotto tono inibitorio o una aumentata attività stimolatoria, iperplasia e

quindi trasformazione adenomatosa di un determinato stipite cellulare ipofisario 25 . In questi ultimi anni, attraverso l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare, sono state acquisite importanti informazioni sulla patogenesi dei tumori ipofisari ²⁶. Benché i processi di iniziazione e promozione coinvolti in queste neoplasie non siano stati completamente definiti, questi studi hanno permesso di chiarire alcuni aspetti eziopatogenetici fondamentali. Attraverso l'analisi dell' inattivazione del cromosoma X è stato possibile dimostrare l'origine monoclonale degli adenomi ipofisari ²⁷ e questo ha dato impulso ad un numero imponente di lavori di ricerca in tutto il mondo volti all'identificazioni di mutazioni geniche in grado di attivare protooncogeni o inattivare oncosoppressori nei tumori ipofisari umani. In particolare il silenziamento dei geni oncosoppressori, chiamati anche tumor-suppressor genes (TSGs), che prevengono la crescita cellulare incontrollata, può avvenire attraverso la delezione eterozigote di uno dei due alleli che codificano il TGS (così chiamata Lost of Heterozigosity LOH) o attraverso la perdita omozigote di entrambi gli alleli ²⁸.

Gli eventi molecolari che portano a silenziamento dei TSGs o a trasformazione dell'espressione genica, assieme ad eventi come disregolazione ormonale ipofisaria e ipotalamica, eccesso di fattori di crescita, stimoli mutageni ambientali come le radiazioni o la somministrazione farmacologica di ormoni, possono agire tutti insieme per promuovere la crescita tumorale ipofisaria ²⁹.

LA SOMATOSTATINA ED I SUOI ANALOGHI LONG-ACTING

La somatostatina è un peptide regolatorio, per la prima volta descritto nel 1973 come ormone ipotalamico, che inibisce il rilascio dell'ormone della crescita dall'ipofisi anteriore.

Due forme biologicamente attive derivano dalla porzione C-terminale di un singolo pro-peptide: somatostatina-14 (SST-14), originariamente descritta nell'ipotalamo³⁰ e la somatostatina-28 (SST-28) estesa nella porzione ammino-terminale, scoperta più tardi nello stomaco³¹. SST-14 e SST-28 sono prodotti in prevalenza dai neuroni e dalle cellule secretorie nel sistema nervoso centrale e periferico e nel tratto gastrointestinale anche se sono stati descritti altri siti di espressione^{32 33 34 35 36}. Il rilascio della somatostatina dai neuroni e dalle cellule secretorie avviene in seguito alla depolarizzazione della membrana o all'aumento della concentrazione del calcio citosolico ed è innescato dagli ormoni secretagoghi, da ioni, da fattori di crescita e nutrienti³⁷.

La somatostatina gioca un importante ruolo inibitorio nella regolazione di diversi organi, come il sistema nervoso centrale, l'ipotalamo e l'ipofisi, il tratto gastrointestinale, il pancreas endocrino ed esocrino, ed altri organi³⁸. La principale funzione è quella dell'inibizione della secrezione di GH e TSH, ma inibisce una varietà di altre funzioni fisiologiche come la motilità gastrointestinale, la produzione di acido gastrico, la secrezione dell'enzima pancreatico, la secrezione di bile e di fluido colonico. Inibisce la secrezione di ormoni come l'insulina, il glucagone, la secretina e il polipeptide intestinale vasoattivo^{38 37}. Inoltre la somatostatina ha un ruolo antiproliferativo ed è ampiamente distribuita come sostanza neurotrasmettitrice nel cervello e nelle cellule del nervo periferico.

L'abilità della somatostatina di inibire una tale varietà di processi fisiologici ne ha predetto l'importante valore terapeutico in condizioni cliniche e patologiche riguardanti iperfunzione degli organi sopra menzionati. Ma proprio a causa dei

simultanei e multipli effetti nei diversi organi e la bassa emivita in circolo del peptide in forma nativa, molto lavoro è stato fatto per sviluppare analoghi della somatostatina con una maggiore stabilità ed una maggiore efficacia terapeutica.

Octreotide, conosciuto anche come SMS201-995, fu il primo analogo long-acting che fu usato per il trattamento dell'acromegalia e di tumori carcinoidi. In particolare questo analogo inibisce la secrezione di GH, glucagone ed insulina con una maggiore efficacia rispetto alla somatostatina nativa ed ha una maggiore resistenza alla degradazione enzimatica. Al momento sono correntemente usati anche altri due analoghi della somatostatina con un profilo di attività un pò diverso: vapreotide (RC-160) e lanreotide (BIM-23014).

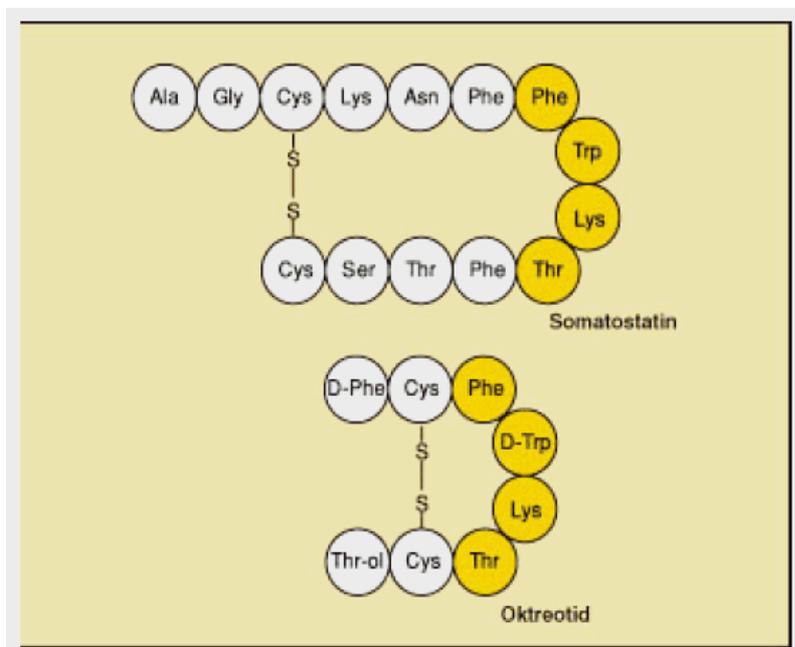


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura primaria e secondaria di somatostatina e octreotide.

I RECETTORI DELLA SOMATOSTATINA

Gli effetti della somatostatina sono mediati da specifici recettori di membrana, che sono stati trovati in diversi organi come il cervello, l'ipofisi anteriore, le cellule endocrine del tratto gastrointestinale e del pancreas, le cellule del sistema immunitario e la retina.

Sono stati clonati e caratterizzati 5 sottotipi recettoriali (SSTR1-5) che condividono la stessa struttura generale. Essi sono formati da una singola glicoproteina con un dominio N-terminale extracellulare, 7 segmenti idrofobici transmembrana, 3 loops extracellulari e un dominio C-terminale intracellulare. Gli SSTRs sono identici per il 42-60 % della sequenza amminoacidica e gran parte degli amminoacidi comuni appartengono al dominio transmembrana. I geni della somatostatina sono situati in cromosomi differenti e questo suggerisce diverse funzioni in diversi organi.

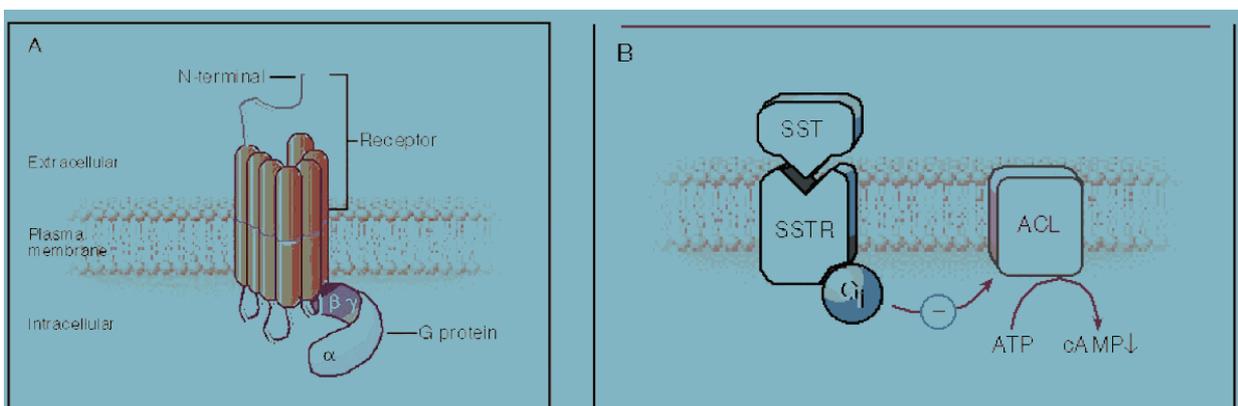
Gli analoghi della somatostatina regolano la proliferazione cellulare sia in vivo che in vitro^{39 40}. In vivo gli effetti antiproliferativi della somatostatina e dei suoi analoghi sulle cellule normali e tumorali potrebbe essere mediata in modo indiretto da un'inibizione ormonale e dall'azione di fattori di crescita.

SSTR2 e SSTR5 sono coinvolti nel controllo del rilascio dei GH; SSTR5 sembra importante nel controllo della secrezione di insulina e di glucagone; SSTR1 potrebbe essere coinvolto nell'angiogenesi; la funzione di SSTR4 è ancora largamente sconosciuta. SSTR1, SSTR2, SSTR4 e SSTR5 mediano l'effetto antiproliferativo, mentre SSTR3 causa apoptosi, inducendo l'espressione di p53 e Bax^{41 42}. Sembra che anche SSTR2 possa indurre apoptosi⁴³.

SSTR1, SSTR2, SSTR4 e SSTR5 determinano arresto del ciclo cellulare nella fase G1, attivando una protein chinasi che aumenta la produzione della proteina oncosoppressiva del retinoblastoma e della p21⁴⁴. Gli SSTRs regolano la crescita cellulare attraverso due meccanismi: la MAP chinasi (mitogen-activated

protein kinase) e la ER chinasi (extracellular regulated kinase). Gli SSTRs possono regolare la proliferazione cellulare attivando tirosine chinasi come Src e JAK2^{45 46} ed in generale sono collegati ad alcuni meccanismi cellulari che comprendono la STAT5, l'inibizione dell'entrata dello ione Ca²⁺, l'attivazione della fosfolipasi A e C, ed altri sistemi cellulari 37. In particolare SSTR2 può anche indurre indirettamente arresto della crescita attivando la ossido nitrico sintetasi 45 . Gli effetti di SSTR5 sono mediati dal meccanismo dei fosfolipidi inositolo/calcio^{47 48}. L'inibizione della proliferazione cellulare da parte di SSTR5 può anche essere mediata da un accoppiamento negativo con il recettore della guanilato ciclastasi 41⁴⁹. Altri studi riportano che SSTR5 attiva il signaling pathway della SAPK/JNK attraverso le α -subunità della proteina G. In generale tutti e 5 i sottotipi recettoriali sono funzionalmente legati all'inibizione dell'adenilato ciclastasi attraverso un meccanismo di accoppiamento con le proteine che legano il nucleotide guanina (G).

Tutti e 5 i sottotipi recettoriali si legano al ligando naturale somatostatina-14 con un'affinità simile, mentre i differenti analoghi si legano con una diversa affinità ai diversi recettori. L'octreotide, lanreotide e la vapreotide si legano con alta affinità a SSTR2 e in misura minore a SSTR5, hanno una bassa affinità per SSTR3, e non si legano a SSTR1 e SSTR4. Octreotide fu infatti scelto tra tanti altri analoghi per il suo effetto di inibizione del rilascio di GH e un basso effetto sul rilascio di insulina, che infatti è regolato da SSTR5⁵⁰.



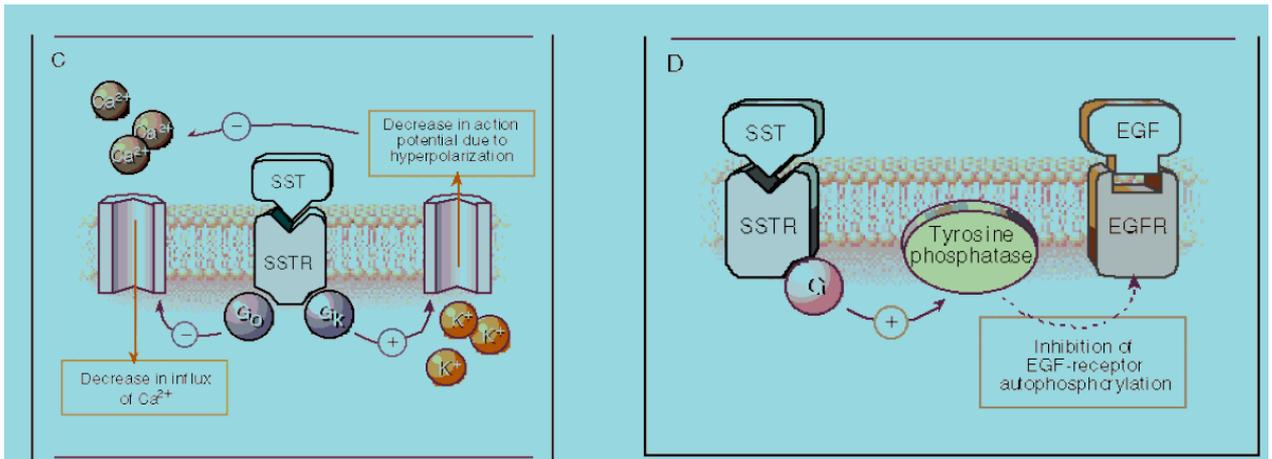


Figura 2: A: proteine G; B: inibizione adenilciclastasi; C: chiusura canali Ca $^{2+}$, apertura canali potassio K $^{+}$; D: attivazione fosfatasi, inibizione recettore EGF

NUOVI SVILUPPI NELLA FISILOGIA DEGLI SSTRs

Negli ultimi anni ci sono state nuove scoperte che hanno aumentato la comprensione della fisiologia dei recettori della somatostatina.

Sono stati testati su colture cellulari primarie analoghi selettivi per SSTR2 e per SSTR5 e si è visto che sono molto più potenti nell'inibire il rilascio di GH degli analoghi usati da soli.

Nel 2000 il gruppo di Patel ha dimostrato, utilizzando le cellule transfettate CHO-K1, che il legame con il ligando induce la dimerizzazione dei recettori della somatostatina. Sia la somatostatina naturale che gli analoghi della somatostatina potrebbero determinare omo- ed etero-dimerizzazione del recettore 1 e del recettore 5. Questo processo di dimerizzazione indotto dal legame col ligando risulta in una aumentata affinità di legame e in una modificazione dei sottotipi recettoriali⁵¹. I diversi membri della famiglia delle proteine recettoriali accoppiate a G sono infatti coinvolti in un cross-talk molecolare che è stato dimostrato aumentarne l'attività funzionale. Inoltre utilizzando le cellule CHO-K1 è stato dimostrato che il recettore della dopamina D2R e SSTR5 interagiscono fisicamente attraverso una etero-dimerizzazione per creare un nuovo recettore che ha un'attività funzionale aumentata⁵².

Melmed et al. hanno dimostrato che la simultanea attivazione di SSTR2 e SSTR5 induce una funzionale associazione di questi sottotipi recettoriali, che risulta in una soppressione sinergica della secrezione di GH⁵³. La simultanea espressione in molti tumori dei diversi sottotipi recettoriali che mediano l'attivazione di una varietà di sistemi intracellulari risulta essere fondamentale nella funzione della somatostatina. Le risposte multirecettoriali e interattive che comprendono omo- ed etero-dimerizzazione e il cross-talk a livello della membrana con il sistema accoppiato della proteina G diventano nuovi concetti fondamentali da seguire per coloro che disegnano e progettano farmaci.

Si apre la strada alla sintesi di molecole ibride, come la molecola BIM-23A387 somatostatina-dopamina, in grado di regolare in modo più fine la sensibilità cellulare ormonale. Questo composto lega con alta affinità sia SSTR2 che il recettore della dopamina, e si è visto che ha in vitro un effetto maggiore sul rilascio di prolattina.

In questo quadro in evoluzione la Novartis company ha introdotto sul mercato un composto universale, il SOM 230, che si lega con elevata affinità a SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5 e con bassa affinità a SSTR4 1.

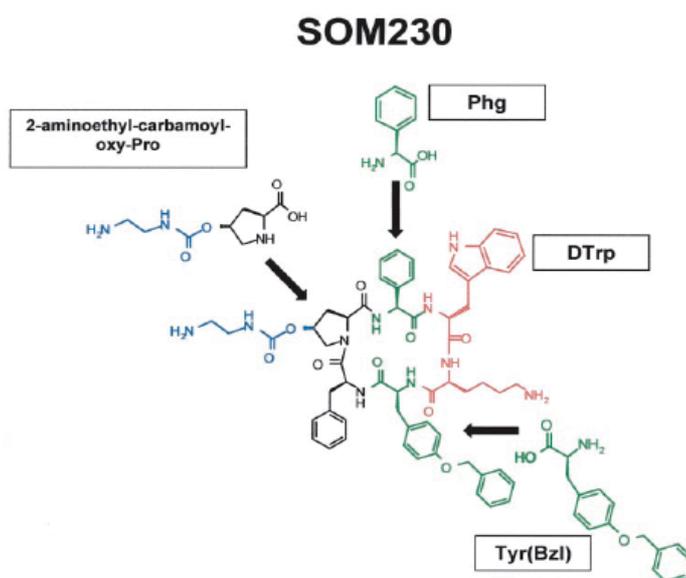


Figura 3: Il SOM230 contiene gli speciali aminoacidi derivati, 2-aminoetil-carbamoyl-oxy-Pro, Phg, Tyr(Bzl), e DTrp (D-triptofano) che contribuiscono fortemente al suo legame unico con sstr1, sst2, sst3, e sst5.

Ha un'emivita di circa 24 ore e ha un effetto inibitorio prolungato sul rilascio di GH e di IGF-1 (insulin growth factor 1) 1 43. Questo analogo può rappresentare un sostanziale miglioramento rispetto agli analoghi della somatostatina in commercio e i pazienti resistenti all'octreotide e coloro affetti da tumori che esprimono diversi recettori della somatostatina potrebbero trarre beneficio da questo composto. Il SOM230 è attualmente sotto valutazione nelle prove cliniche di fase 1 1.

In ultimo il SOM230 è stato proposto recentemente come nuovo e più potente analogo per la "imaging and targeted radiotherapy" al posto di octreotide, in quanto, come già accennato, una varietà di tumori umani, specialmente i neuroendocrini e le loro metastasi, overesprimono i 5 recettori della SST. L'OctreoScan ([¹¹¹In-diethylentriaminepentaacetic acid (DTPA)]-octreotide), esame scintigrafico in grado di magnificare la presenza del sottotipo recettoriale 2, rimane per il momento il radioligando attualmente approvato per la scintigrafia dei pazienti con tumori neuroendocrini ⁵⁴, ma avendo un'affinità bassa per SSTR5 e molto bassa per SSTR3, e non essendo un esame quantitativo, non è in grado di predire esattamente l'efficacia degli analoghi della SST attualmente in uso (octreotide e lanreotide) e soprattutto dei farmaci di nuova generazione.

Table 1 Ligand binding affinities of selected somatostatin analogues at sst1–sst5 receptors

Compound	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5	Reference
Natural ligands						
SST-14	0.1–2.3	0.04–1.3	0.3–1.6	0.3–2.0	0.2–2.32	Liapakis <i>et al.</i> 1996a Yang <i>et al.</i> 1998b Culler <i>et al.</i> 2002 Bruns <i>et al.</i> 1996 Patel and Srikant 1994 Reisine and Bell 1995 Shimon <i>et al.</i> 1997b rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
SST-28	0.1–2.4	0.2–4.1	0.3–6.1	0.3–7.9	0.05–0.4	Liapakis <i>et al.</i> 1996a Bruns <i>et al.</i> 1996 Patel and Srikant 1994 Reisine and Bell 1995 Shimon <i>et al.</i> 1997b rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
hCST-17	0.3–7.0	0.6–0.9	0.4–0.6	0.5–0.6	0.3–0.4	Fukusumi <i>et al.</i> 1997 rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
rCST-14	1.7–5.0	0.1–1.8	0.3–3.8	0.2–18.2	0.3–1.9	rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
rCST-29	2.8–2.9	7.1	0.2	3.0	13.7	Patel 1997 rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
Synthetic peptides						
Octreotide (SMS 201–995)	290–1140	0.28–2.1	4.4–38	>1000	0.77–32	Culler <i>et al.</i> 2002 Bruns <i>et al.</i> 1996 Patel and Srikant 1994 Reisine and Bell 1995 Shimon <i>et al.</i> 1997b Osapay <i>et al.</i> 1997 rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
Lanreotide (BIM 23014)	500–2330	0.5–1.8	43–107	66–2100	0.6–14	Culler <i>et al.</i> 2002 Bruns <i>et al.</i> 1996 Patel and Srikant 1994 Reisine and Bell 1995 Shimon <i>et al.</i> 1997b rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
Vapreotide (RC-160)	481→1000	5.4	31	45–351	0.7–7.5	Patel and Srikant 1994 rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
BIM 23244	>1000	0.3	133	>1000	0.7	Culler <i>et al.</i> 2002
Seglitide (MK-678)	>10000	0.05–1.5	27–230	127–4949	0.06–232	Liapakis <i>et al.</i> 1996a Yang <i>et al.</i> 1998b rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
BIM 23052	6.3–100	10–13.5	2.1–5.6	16–141	1.2–18	Liapakis <i>et al.</i> 1996a rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
BIM 23056	110→1000	132→1000	10.8–177	17–234	5.7–158	rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
L-362,855	830→1000	1.0–2.0	5.1–6.2	63→1000	0.002–63	rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
BIM 23268	18.4	15.1	61.6	16.3	0.37	rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
CYN 154806	1200	3.6	150	650	2.0	rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
CH 275	1.8–4.9	740→1000	12→1000	4.3–874	980→1000	rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
Non-peptide agonists						
NNC 26-9100	5000	3300	6800	100	4100	rev. in Hannon <i>et al.</i> 2002
L-054,264	1740	1.6	2950	2000	4470	Yang <i>et al.</i> 1998a
L-054,522	2392	0.01	31	81	163	Yang <i>et al.</i> 1998b

Tabella 1: **Affinità di legame dei selettivi analoghi della somatostatina ai recettori sstr1-5.**

MATERIALI E METODI

CAMPIONAMENTO E STOCCAGGIO DEI TESSUTI

TUMORI GASTRO-ENTERO-PANCREATICI

Sono stati inclusi nello studio 20 tumori gastro-entero-pancreatici (10 pancreatici e 10 intestinali). Questi tumori sono stati rimossi con chirurgia laparotomia nella sede di provenienza del tumore, e diagnosticati con reperti clinici, biochimici, immunoistochimici, radiologici e chirurgici. Sono stati processati anche tessuti derivati da ghiandole pituitarie normali umane, ottenute da pazienti post-mortem, per il loro utilizzo nelle successive amplificazioni in Real Time, come controlli positivi.

#	Tessuto [sede primitiva tumore]	Istologico	Sesso	Età	Ki67 (%)	Octreoscan	Stato malattia a 12 mesi
P1	Pancreas	VIPoma	F	66	3	+	DF
P2	Pancreas	Insulinoma*	F	31	1.6	-	DF
P3	Pancreas	Insulinoma	F	57	4.9	-	DF
P4	Pancreas	Gastrinoma	M	84	1.3	+	SD
P5	Polmone [pancreas]	Carcinoide del pancreas	M	73	2.1	+	DF
P6	Fegato [pancreas]	Carcinoide del pancreas	F	44	4	+	SD
P7	Pancreas	Carcinoma ben differenziato	M	74	3.1	+	SD
P8	Fegato [pancreas]	Ca. scarsamente differenziato	F	48	25	-	PD
P9	Pancreas	Ca. scarsamente differenziato	F	48	10	-	PD
P10	Fegato [pancreas]	Carcinoma ben differenziato	M	59	1.6	+	DF

#	Tessuto [sede primitiva tumore]	Istologico	Sesso	Età	Ki67 (%)	Octreoscan	Stato malattia a 12 mesi
GI1	Duodeno	Gastrinoma *	M	41	1.2	/	SD
GI2	Papilla di Vater	Somatostatinoma	F	51	1.6	/	DF
GI3	Fegato [ileo]	Carcinoma ben differenziato	F	41	2	+	DF
GI4	Ileo	Carcinoma ben differenziato	M	59	4	+	DF
GI5	Fegato [ileo]	Carcinoma ben differenziato	F	59	2.3	+	DF
GI6	Fegato [ileo]	Carcinoma ben differenziato	F	74	0.6	+	PD
GI7	Fegato [ileo]	Carcinoma ben differenziato	M	58	4.9	+	SD
GI8	Fegato [ileo]	Carcinoma ben differenziato	F	29	0.7	+	SD
GI9	Stomaco	Tumore ben differenziato *	M	41	0.8	/	SD
GI10	Fegato [stomaco]	Carcinoma ben differenziato	M	59	1.6	/	PD

Tabella 2: Lista dei tumori gastro-entero-pancreatici. Sono date delle informazioni sul sesso, sull'età, sulla diagnosi clinica e sullo stato della malattia a 12 mesi (DF= disease free, SD= stable disease, PD= progressive disease). Nella colonna [Istologico] il simbolo * sta per patologia MEN 1.

Il prelievo biotico viene ripartito in piccole aliquote che vengono immediatamente congelate mediante ghiaccio secco, in condizioni Rnasi free, e stoccate a -80°C fino al momento dell'uso. Una porzione viene destinata all'estrazione di mRNA per finalità di PCR ed un'altra aliquota viene conservata congelata per esperimenti di immunohistochemica o destinata ad altro studio.

ADENOMI IPOFISARI

Questo studio è stato effettuato dopo l'approvazione del comitato etico ed il consenso informato di ciascun paziente. Sono stati inclusi nello studio 34 adenomi ipofisari (12 ACRO, 4 CUSH, e 18 NFPA).

Questi tumori sono stati rimossi con chirurgia trasfenoidale e diagnosticati con reperti clinici, biochimici, radiologici e chirurgici. Dopo l'intervento neurochirurgico è stata effettuata su ciascun tumore la diagnosi con immunohistochimica. Come per i tumori gastro-entero-pancreatici sono stati utilizzati come controlli positivi per le determinazioni in Real Time, gli stessi tessuti derivati da ghiandole pituitarie normali umane.

Il prelievo biotico viene ripartito in piccole aliquote ed una di queste viene immediatamente processata per generare colture cellulari primarie per la valutazione dell'effetto antisecretorio ed antiproliferativo degli analoghi della SST. Le altre aliquote vengono immediatamente congelate mediante ghiaccio secco, in condizioni Rnasi free, e stoccate a -80°C fino al momento dell'uso. Una porzione viene destinata all'estrazione di mRNA per finalità di PCR ed un'altra aliquota viene conservata congelata per esperimenti di immunohistochimica o destinata ad altro studio.

I dati clinici dei pazienti e la diagnosi immunohistochimica di ciascun tumore sono presentati nelle tabelle qui di seguito.

Caso #	Sesso	Età	IHC	GH pre-operatorio (ng/ml)	IGF-I pre-operatorio (ng/ml)
A1	F	50	GH/PRL	7.5	621
A2	M	43	GH	27.0	817
A4	F	30	GH/PRL	12.5	826
A8	M	34	GH	19.9	371

Caso #	Sesso	Età	IHC	GH pre-operatorio (ng/ml)	IGF-I pre-operatorio (ng/ml)
C1	F	39	ACTH	230	207.0
C2	F	36	ACTH	61	200.0
C3	M	70	ACTH	122	121.1

Caso #	Sesso	Età	ICH
N1	F	14	n.d.
N2	M	70	FSH/LH/ α -sub
N3	M	63	Nessuno
N4	M	55	FSH/ α -sub
N6	M	54	LH/ α -sub
N7	F	57	Nessuno
N8	F	60	FSH/LH
N11	M	65	None
N12	F	31	FSH

Tabella 3: **Lista degli adenomi ipofisari usati in questo studio. Sono date delle informazioni sul sesso, sull'età, sulla diagnosi clinica e, nel caso in cui i tumori sono clinicamente attivi, il valore pre-operatorio ormonale di ciascun paziente. Nella colonna [IHC] sono elencati i valori dell'esame immunocistochimico per i 5 ormoni e l' α -subunità in ciascun caso.**

COLTURE CELLULARI

Gli adenomi ipofisari vengono dispersi meccanicamente ed enzimaticamente (5 g/L di Dispasi I, 0.01 g/L di DNAasi II, 0.1 g/L soybean inibitore della tripsina e 1 g/L ialuronidasi II). La dispersione enzimatica è seguita da due cicli di centrifugazione a 1500 rpm per 5' e le cellule sono infine risospese in mezzo DMEM con 10% FCS, 26.2 mmol/L NaHCO₃, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L glutamina, 10 ml/L amminoacidi non essenziali, 10 ml/L MEM vitamine, 5 mg/L insulina, 20 mg/L sodio selenite, 5 mg/L transferrina e 30 pmol/L T3, 2.5 mg/L amphotericina B, e 10⁵ U/L penicillina/streptomina. La vitalità delle cellule così ottenute viene valutata con la colorazione di arancio di acridina-etidio bromuro. Solo le cellule tumorali che avevano una vitalità maggiore dell'80% sono state incluse nel presente studio.

Le cellule vengono seminate in piastre da 96 pozzetti (104 cellule per pozzetto) e lasciate per tutta la notte nell'incubatore in un'atmosfera con 5% CO₂ a 37°C. Il giorno successivo sono trattate per 24h con gli analoghi della somatostatina, Octreotide e SOM230 (Novartis, Basel, Svizzera), diluiti in DMEM con 0.5% FCS in una concentrazione finale di 1µM. I farmaci sono stati sciolti precedentemente in acido acetico 0.01M per avere soluzioni stock 10⁻³ mol/L, che sono state aliquotate e conservate a -20°C. Per ogni esperimento è stata scongelata e utilizzata una nuova aliquota.

Quando possibile viene effettuato uno studio dose risposta con le seguenti concentrazioni di ciascun analogo: 1µM, 100, 10, 1nM.

Dopo 24h di trattamento il mezzo di coltura viene raccolto e con saggio immunoenzimatico vengono misurati gli ormoni GH e ACTH per valutare l'effetto sull'attività secretoria. Per il dosaggio ormonale viene utilizzato il kit del "Nichols Institute" (San Juan Capistrano, CA, USA), seguendo il protocollo

fornito dalla ditta produttrice. Tutte le misurazioni sono state effettuate in quadruplicato.

La crescita cellulare e l'eventuale azione antiproliferativa dei composti ad azione agonista la SST, viene valutata con il test di proliferazione cellulare WST-1 (Roche Molecular Biochemicals, Penzberg, Germania), che misura l'attività delle deidrogenasi mitocondriali, sistema attivo solo nelle cellule vitali.

Dopo 24h di trattamento con SOM230 e octreotide, viene aggiunto il WST-1 in ciascun pozzetto della piastra da 96 con una diluizione finale di 1:10. Viene lasciato in incubazione per 1h a 37°C, poi viene letto l'assorbimento a 440 nm, usando un microplate reader Dynatech MR5000 (Dynatech, Billinghamurst, Sussex, UK). Tutte le misurazioni sono state fatte in quadruplicato.

ESTRAZIONE DELL'RNA DA TESSUTO

I tessuti congelati sono stati polverizzati con bisturi sterile monouso in ghiaccio secco, allo scopo di impedire lo scongelamento del campione ed evitando così la degradazione dell'RNA. La polvere di tessuto così ottenuta ancora congelata viene trattata con 700-800 μ l di Trizol (Invitrogen, Scotland, UK) e omogenizzata con l'aiuto di una siringa sterile da 2,5 ml. I campioni vengono quindi lasciati per 5' a temperatura ambiente e successivamente incubati per 2-3' con 200 μ l cloroformio per ml di Trizol, allo scopo di favorire la stratificazione e separazione delle varie fasi. Si prosegue quindi alla centrifugazione a 12000 rpm per 5' a 2-8°C. Il supernatante così ottenuto, contenente l'RNA, viene trasferito in una eppendorf Dnasi/RNasi free, e trattato con 500 μ l di isopropanolo per ml di Trizol, miscelato manualmente per 20' circa e incubato a temperatura ambiente per 10'. Si prosegue quindi con una seconda centrifugazione a 12000 rpm per 10'a 2-8°C, il pellet così ottenuto viene ulteriormente centrifugato con alcool al 70%, a 7500 rpm per 5'a 2-8°C, allo scopo di liberare il pellet di RNA da eventuali residui ed impurità presenti. Il pellet verrà poi risospeso in 30-40 μ l di acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) che previene la degradazione dell'acido ribonucleico ad opera delle RNasi. Si quantifica quindi l'acido nucleico estratto mediante lettura spettrofotometrica a 260nm (A_{260} x fattore di diluizione x 40 μ g/ml) e si verifica la purezza dell'RNA valutando il rapporto delle assorbanze A_{260} / A_{280} che deve essere compresa tra 1.8 e 2.1.

Prima di procedere con la restrotrascrizione dell'RNA totale estratto occorre decontaminare il campione da qualsiasi traccia di DNA genomico eventualmente presente. A tal fine, è sufficiente sottoporre l'RNA totale

all'azione dell'enzima DNasi I, utilizzando il kit DNA-free™ dell'Ambion e seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. In breve si procede con la preparazione di una mix contenente 1X DNasi I Buffer, 2U rDNasi I, RNA totale (fino a un massimo di 2 µg) e acqua DEPC in volume finale di 20µl per campione. Si incuba a 37°C per 30' e si inattiva l'enzima trattando con 2µl di Soluzione Inattivante la Dnasi ed incubando 2' a temperatura ambiente. Si centrifuga a 10000 rpm per 1.5', si recupera il supernatante, si trasferisce in una provetta Dnasi/RNasi free e si determina la concentrazione e la purezza dell'acido nucleico estratto mediante lettura spettrofotometrica a 260nm e 280nm.

RETROTRASCRIZIONE DELL'RNA

La retrotrascrizione è quella reazione che consente di ottenere, a partire da un filamento stampo di RNA, una molecola di DNA ad esso complementare (cDNA). L'enzima necessita però di una breve sequenza nucleotidica d'innescamento (primer) per poter iniziare la retrotrascrizione dell'RNA. Sfruttando la caratteristica dell'RNA messaggero di possedere una coda di circa 150–200 adenine (poliA) all'estremità 3', è possibile utilizzare come innescamento un oligonucleotide costituito da una catena di timine (oligo(dT)) complementari alle adenine presenti nel messaggero.

La retrotrascrizione è stata eseguita utilizzando protocollo e reagenti forniti dall'Invitrogen. Si procede alla preparazione di una mix contenente: 1X RT Buffer, 0.5mM di dNTPs, 10mM di DTT, 0.5_M di primer Oligo(dT)₁₂₋₁₈, 40U RNaseOUT™, 200U di Superscript II, in un volume totale di 10µl per campione. Questa mix verrà aggiunta al campione di RNA, 1µg di RNA diluito in 10µl di acqua DEPC, per ottenere un volume finale di 20µl. Si procede quindi con l'incubazione a 45°C per 1 ora, affinché la Superscript II (retrotrascrittasi) operi la retrotrascrizione dell'RNA; successivamente, allo scopo di inattivare

l'enzima, i campioni vengono portati a 95°C per 5 minuti; il cDNA così ottenuto, verrà stoccato a -20°C.

REAL TIME PCR

La Real Time retro trascrittasi (RT) PCR determina la quantità iniziale di template in maniera più specifica, sensibile e riproducibile rispetto alle altre forme di RT-PCR quantitativa che analizzano la quantità finale del prodotto di amplificazione.

La Real Time PCR monitorizza la fluorescenza emessa durante la reazione come indicatore della produzione di amplificati durante ogni ciclo di PCR (in tempo reale, quindi) in maniera opposta alla determinazione dei prodotti finali come invece avviene nei metodi convenzionali di PCR quantitativa.

Il sistema della Real Time PCR è basato sull'analisi e la quantificazione di un reporter fluorescente. Questo segnale aumenta in maniera direttamente proporzionale alla quantità di prodotto di PCR in una reazione. Per registrare la quantità di emissione della fluorescenza ad ogni ciclo, è possibile monitorare la reazione di PCR durante la fase esponenziale dove il primo significativo aumento nella quantità dei prodotti di PCR correla con la quantità iniziale di template del target.

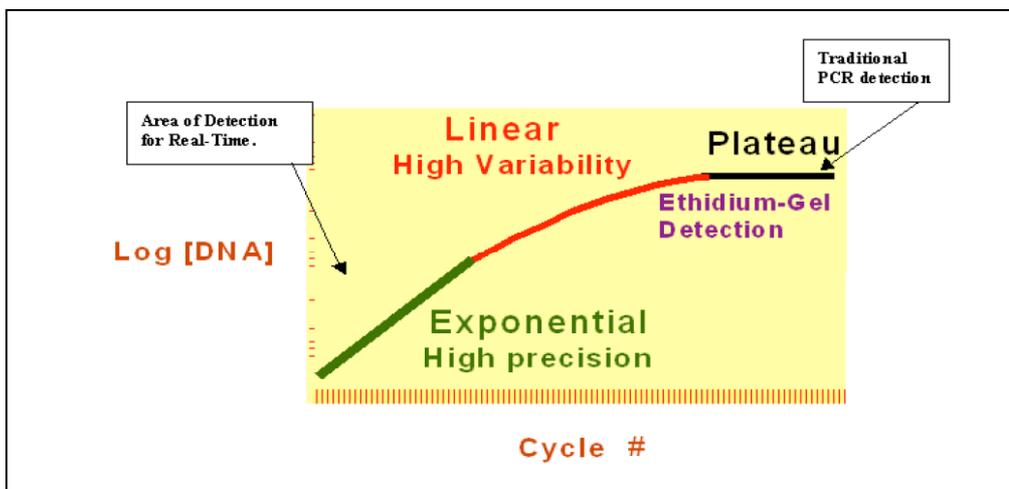


Figura 4: Grafico della funzione lineare di una reazione di PCR.

Ci sono due metodi generali per l'analisi quantitativa dell'amplificato: le sonde fluorescenti (TaqMan, Beacon) o gli agenti che si legano a DNA (SYBR green). Nel nostro studio abbiamo scelto di utilizzare le sonde TaqMan che usano l'attività 5' esonucleasica della Taq polimerasi per misurare la quantità delle sequenze del target nei campioni di cDNA.

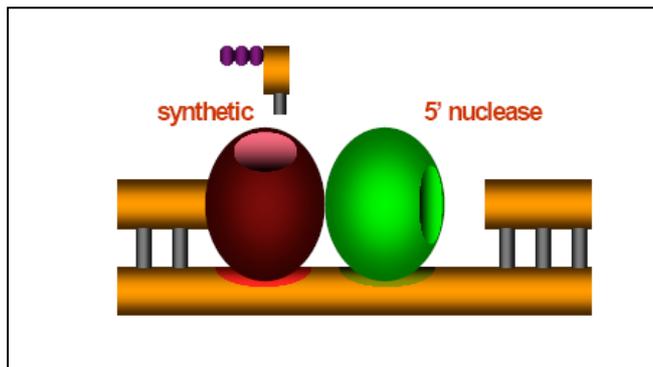


Figura 5: Attività 5' esonucleasica.

Le sonde TaqMan sono oligonucleotidi più lunghi dei primer (lunghi 20-30 basi con una T_m di 10° più alta di quella dei primer) che contengono un dye fluorescente sulla base al 5', e un dye silenziatore (quencher), di solito TAMRA, tipicamente sulla base al 3'. Quando irradiato, il dye fluorescente eccitato trasferisce energia alla vicina molecola di quencher piuttosto che emettere (questo è chiamato FRET= fluorescence resonance energy transfer). La stretta vicinanza del reporter e del quencher previene l'emissione di ogni fluorescenza quando la sonda è intatta. Le sonde TaqMan sono disegnate per appaiarsi ad una regione interna del prodotto di PCR.

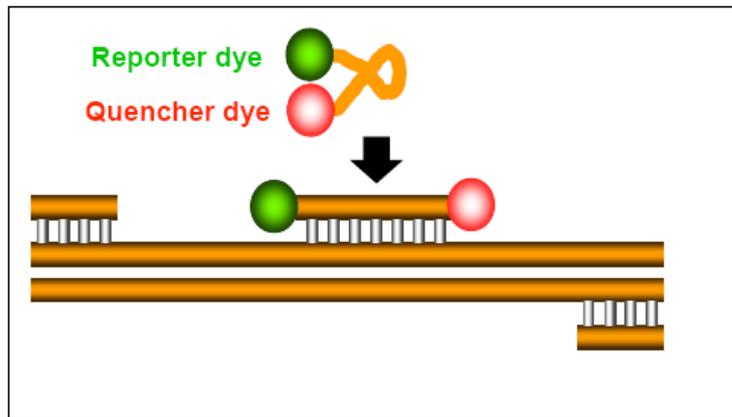


Figura 6: Appaiamento della sonda TaqMan.

Quando la polimerasi duplica un template sul quale è legato una sonda TaqMan, l'attività 5' esonucleasica taglia la sonda. Ciò spegne l'attività del quencher e il dye reporter comincia ad emettere una quantità di fluorescenza che aumenta ad ogni ciclo in maniera proporzionale alla percentuale di sonda tagliata. L'accumulo dei prodotti di PCR viene determinata al monitoraggio dell'aumento della fluorescenza del dye reporter.

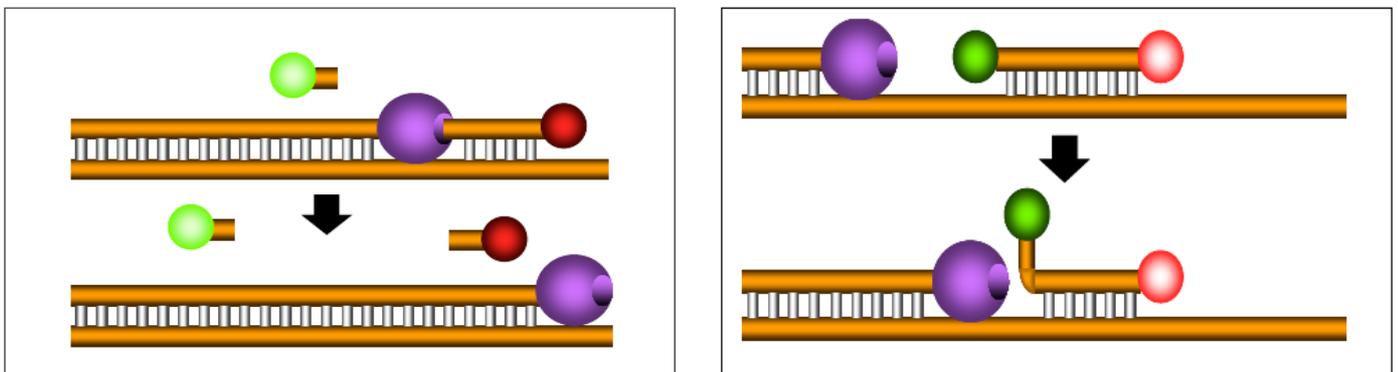


Figura 7: Funzionamento della sonda TaqMan.

La reazione con sonde TaqMan utilizza parametri di reazione e condizioni di PCR universali. Poiché il taglio avviene solo se la sonda è ibridizzata al target, la fluorescenza rilevata origina solo da amplificati specifici. Il processo di ibridizzazione e taglio non interferisce con l'accumulo esponenziale di prodotto. Una richiesta specifica per le sonde fluorogeniche è che non ci siano G

all'estremità 5'. Una "G" adiacente al dye reporter spegne la fluorescenza del reporter anche dopo il taglio.

Il ciclo soglia o valore di C_t è il ciclo al quale si osserva il primo significativo aumento della fluorescenza. Il ciclo soglia si verifica quando il sistema di rivelazione inizia a captare un aumento nel segnale associato ad una crescita esponenziale dei prodotti di PCR durante la fase logaritmica-lineare.

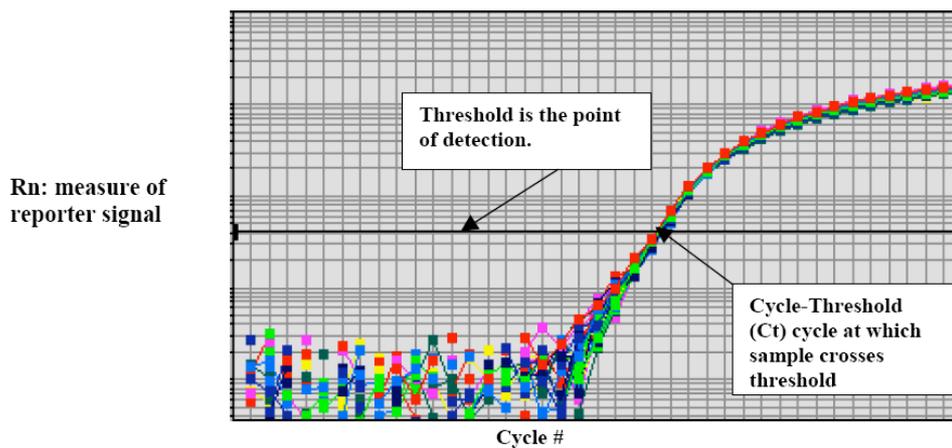


Figura 8: Grafico della fluorescenza.

Questa fase ci fornisce le informazioni più utili circa la reazione. La pendenza della fase log-lineare riflette l'efficienza di amplificazione.

Il parametro più importante per la quantificazione è il C_t . Maggiore è la quantità iniziale di DNA, prima verrà rilevato il prodotto accumulato durante la PCR, e più basso sarà il valore di C_t . La scelta del ciclo soglia, che determinerà il valore di C_t , è determinata in modo automatico dalla macchina ma può essere effettuata anche dall'operatore. In quest'ultimo caso dovrebbe essere posto sopra ogni attività di base, nella fase di crescita esponenziale (che diventa lineare nella trasformazione logaritmica).

Il sistema di quantificazione utilizzato nel nostro studio è l'iQ iCycler software (Versione 3.0, Biorad) che permette la determinazione del ciclo soglia attraverso un'analisi matematica della curva di crescita. Questo consente una migliore riproducibilità curva per curva.

PROGETTAZIONE DEI PRIMERS

Vengono generati primers e sonde TaqMan specifici per le 5 forme dei recettori della SST. Gli oligonucleotidi, primer senso e antisenso (sintetizzati dalla ditta Invitrogen™ life technologies) e la sonda (sintetizzata, marcata e purificata da Applied Biosystems Foster City, CA), sono stati progettati con l'aiuto del programma Beacon Designer (version 2.1; Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) facendo riferimento alle sequenze nucleotidiche contenute nel database GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) con i seguenti numeri di accesso:

SSTR1	NM_001049
SSTR2	NM_001050
SSTR3	NM_001051
SSTR5	NM_001053

Siccome è noto che le 5 sequenze di SSTR sono altamente omologhe (omologia del 42-60 % della sequenza amminoacidica), particolare cura è stata data al fine di generare oligonucleotidi in grado di riconoscere specificatamente e unicamente mRNA codificante per ciascuno dei 5 recettori. Proprio per la difficoltà di disegnare gli appositi oligonucleotidi, tenendo conto delle regioni geniche specifiche per ogni recettore, tale operazione si è rivelata particolarmente difficoltosa e dispendiosa in termini temporali.

Per ogni gene è stata identificata la coppia di primers più adatta controllando la specificità delle sequenza sul sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/Blast.cgi> e la struttura secondaria dell'amplicone sul sito <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna>.

Tutte le coppie di primer sono state disegnate per produrre un amplificato più corto di 100 bp. Amplificati piccoli danno risultati più consistenti perché la PCR è più efficiente e più tollerante delle condizioni di reazione.

Grazie alla collaborazione del Dr. Michael Culler (Biomeasure Inc. Company Milford, Massachusetts), la specificità di ciascun amplicone è stata verificata con l'utilizzo di linee cellulari di CHO (Chinese Hamster Ovary) transfettate ciascuna rispettivamente con il vettore riportante uno solo dei 5 recettori per la SST. E' stata inoltre adottata la linea cellulare CHP404 di neuroblastoma umano, gentilmente fornitaci dal Dr. Claudio Orlando dell'Università di Firenze, esprimente unicamente il recettore 2, per un'ulteriore conferma della specificità dell'amplificato di SSTR2.

Le coppie di primers utilizzate per ogni gene e le rispettive caratteristiche sono riportate nella tabella qui di seguito.

Gene	Sequenza del primer	Sequenza della sonda	Lunghezza amplicone (bp)
SSTR1	5'-ATCTGCTGGATGCCTTTCTACG-3' 5'-TAGCCGAGGATGACCGACAG-3'	5'-TCACCGTGGCGTCGTCCTGCTCA-3'	94
SSTR2	5'-TCGGCCAAGTGGAGGAGAC-3' 5'-AGAGACTCCCCACACAGCCA-3'	5'-CCGGACGGCCAAGATGATCACC-3'	62
SSTR3	5'-CGTCAGTGGCGTTCTGATCC-3' 5'-TGTGCCGAGGACCACATA-3'	5'-ATGACCAGCGAGTTACCCAGCAGGC-3'	95
SSTR5	5'-ATCCTCTCCTACGCCAACAGC-3' 5'-GGAAGCTCTGGCGGAAGTT-3'	5'-CCCGTCCTCTACGGCTTCCTCTCTGA-3'	75

Tabella 4: Schema riassuntivo dei primers e delle sonde utilizzati con le relative le dimensioni dell'amplicone.

Le temperature di annealing e le condizioni di reazione dei primers sono state ottimizzate con l'utilizzo delle Curve di Melting, con Saggio Sybr Green

(intercalante della doppia elica di DNA che emette 200 volte più fluorescenza dell'etidio bromuro). In breve il prodotto di PCR viene sottoposto ad una lenta denaturazione. Quando si raggiunge la temperatura di denaturazione del prodotto (temperatura di melting), si ha una rapida perdita di fluorescenza; prodotti di PCR non specifici e dimeri di primers vengono facilmente evidenziati perché hanno una temperatura di melting più bassa dei prodotti di PCR desiderati.

REAZIONE DI PCR

Le PCR Real-Time vengono allestite utilizzando il detection system del Biorad. La sonda è stata marcata al 5' con il dye reporter fluorescente FAM (6-carboxy fluorescein) e al 3' con il quencher TAMRA (6-carboxytetramethyl rhodamine). Le reazioni di Real-Time PCR sono state allestite in 25 μ l di volume con 2X IQ Supermix (BioRad Laboratories,, Hercules, CA) contenente Taq-polymerase, dNTPs, PCR buffer, MgCl₂ 6mM. Tutte le reazioni sono state effettuate in duplicato, con 50ng di cDNA, 300 μ M di primers e 300 μ M di sonda Taqman. Il profilo termico di tutte le reazioni è stato il seguente: primo step a 95° per 3 min, 50 cicli a 95° per 30 s e 60° per 1 min.

I dati della Real-Time sono stati analizzati usando il programma di quantificazione iCycler iQ, versione 3.0 del Biorad. La quantità dei cDNA derivati dai campioni tumorali viene ricavata interpolando dalla curva standard che viene allestita con cDNA ottenuti da RNA estratti da linee cellulari che sovraesprimono i 5 SSTR (la linea cellulare CHP404 sovraesprime l'SSTR2, le linee CHO trasfettate sovraesprimono gli SSTR1-3-5). Gli RNA estratti da queste linee cellulari vengono retrotrascritti seguendo la procedura sopra descritta. Il cDNA viene diluito serialmente, per ottenere gli standard delle curve, da 5x10⁴ a 16pg di RNA totale. I risultati sono espressi come pg equivalenti CHP404-CHO di RNA / μ g RNA totale.

ANALISI STATISTICA

Per l'analisi statistica dei dati riguardanti gli adenomi ipofisari sono stati utilizzati il test t di Student e il test di Mann-Whitney Rank Sum.

I dati ottenuti dai tumori gastro-entero-pancreatici sono stati analizzati, previa trasformazione logaritmica con base 10, con l'analisi della varianza (ANOVA), il coefficiente di correlazione lineare di Spearman e la regressione lineare tramite software SPSS® 13 per Windows. La descrizione dei dati è stata effettuata utilizzando i valori medi, la deviazione standard (DS) e le frequenze.

La significatività statistica è stata assegnata ad un valore di $P < 0.05$.

TUMORI

I campioni tumorali selezionati per questo studio sono tutti adenomi ipofisari non funzionanti (NFPA), che esprimono SSTR2 e/o SSTR5, ma che sono resistenti al trattamento con gli analoghi della SST. Alcuni campioni sono stati inclusi nello studio anche se presentano un livello più basso di recettori, poiché le biopsie tumorali stoccate a -80°C appartenenti a molti campioni, erano ormai esaurite al momento della selezione per lo studio genetico.

ESTRAZIONE DEL DNA DA TESSUTO

L'estrazione è avvenuta usando il protocollo del Puregene™ DNA Isolation Kit (Gentra System, Minneapolis, MN); tale metodo è basato sul principio del “Salting out” che prevede:

Lisi cellulare: in una eppendorf sterile si pongono 10-20 mg di tessuto ancora congelato e si aggiungono 600 μl di Cell Lysis Solution (soluzione di Tris aminometano, EDTA ed SDS); si aggiungono 5 μl di una soluzione 15.1mg/ μl di proteinasi K (Roche) e si fa incubare tutta la notte a 55°C o finché il tessuto è completamente dissolto.

Precipitazione proteine: si fa raffreddare il campione a temperatura ambiente e si aggiungono 200 μl di Protein Precipitation Solution (soluzione di acetato di ammonio). Si vortexa vigorosamente per 20 secondi, quindi si centrifuga per 3 minuti a 13000 g e si ha la formazione di un pellet proteico di colore marrone.

Precipitazione del DNA: si mette il supernatante contenente il DNA in una provetta contenente 600 μl di Isopropanolo al 100% v/v quindi si inverte delicatamente la provetta fino alla comparsa di un residuo filamentoso (DNA genomico). Quindi si centrifuga a 13000 g per 1 minuto (il DNA è visibile come

un aggregato bianco sul fondo della provetta) e si lascia sgocciolare la provetta su carta assorbente. Si lava il pellet di DNA con 600µl di Etanolo al 70% v/v, si centrifuga a 13000 g per 1 minuto, si elimina il supernatante e si lascia asciugare per circa 15 min.

Idratazione DNA: si aggiungono 50-100µl di DNA Hydration Solution (Tris-EDTA) e si lascia reidrattare il DNA per 12 ore a temperatura ambiente, quindi si conserva in frigorifero a 4°C.

Si determina la concentrazione e la purezza del DNA genomico estratto mediante lettura spettrofotometrica a 260nm e 280nm (A_{260} , rapporto A_{260} / A_{280}) e viene preparata per ciascun campione una diluizione di 30ng/µl.

ESTRAZIONE DEL DNA DA SANGUE

Il DNA genomico viene estratto da sangue in toto usando il protocollo Qiagen “QIAamp DNA Blood Mini Kit” che si basa sul principio di purificazione degli acidi nucleici tramite adsorbimento su colonna silicica per affinità. In breve si mescolano 200µl di sangue intero con 20µl di una soluzione 15.1mg/µl di proteinasi K (fornita dal kit) in una provetta. Si aggiungono 200µl di Buffer AL (fornito dal kit), si mescola immediatamente vortexando per 15’’ e si mette ad incubare a 56°C per 10’. Si aggiungono 200µl di etanolo assoluto e si mescola vortexando per 15’’. Si trasferisce la miscela nella colonnina fornita dal kit e si centrifuga a 9000 rpm per 2’. Si inserisce la colonnina col filtro in una provetta da 2ml nuova e si aggiungono 500µl di Buffer AW1 (fornito dal kit). Si centrifuga a 9000 rpm per 1’. Si butta la provetta contenete il filtrato e si inserisce nuovamente la colonnina in una provetta da 2ml. Si aggiungono 500µl di Buffer AW2 (fornito dal kit) e si centrifuga a 16400 rpm per 5’. Si inserisce la colonnina in una provetta eppendorf sterile e si eluisce il DNA con 200µl di Buffer AE. Si lascia incubare a temperatura ambiente per 5’ e si centrifuga a 9000 rpm per 2’. Si determina la concentrazione e la purezza del DNA

genomico estratto mediante lettura spettrofotometrica a 260nm e 280nm (A_{260} , rapporto A_{260}/A_{280}) e si congela il DNA a -20°C fino al momento dell'uso.

AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR

Si decide di condurre l'analisi molecolare studiando solo le regioni esoniche e i segmenti intronici immediatamente a monte e a valle dell'esone ("flanking regions").

Sono stati disegnati primers usando il programma "Primer 3.0" disponibile presso Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research server (<http://www.genome.wi.mit/cgi-bin/primer/primer3.cgi>).) facendo riferimento alle sequenze nucleotidiche contenute nel database GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con i seguenti numeri di accesso:

SSTR2 NT_010641

SSTR5 HS349E11

Gene	Sequenza del primer	Temperatura di annealing	Lunghezza amplicone (bp)
SSTR2 Esone 1	5'- cccagagccccagtctga -3' 5'-cttctcgtcctccatctc -3'	$T_m = 62^{\circ}\text{C}$	301
SSTR2 Esone 2 a	5'- gtgaaagataatacattttcaattt - 3' 5'- cacaaccaatgatgcagac -3'	$T_m = 60^{\circ}\text{C}$	356
SSTR2 Esone 2 b	5'- gacaagcaatgcagtcctca -3' 5'- ctgtgtaccaagccccagat -3'	$T_m = 60^{\circ}\text{C}$	500
SSTR2 Esone 2 c	5'- atgacaccatggctgtgtg -3' 5'- gcagaggacattctggaagc - 3'	$T_m = 60^{\circ}\text{C}$	504
SSTR2 Esone 2 d	5'- ccctatcctatatgccttctgtc -3' 5'- tgagtttcaatacacaaacacag - 3'	$T_m = 59^{\circ}\text{C}$	519

Tabella 5: Schema riassuntivo dei primers utilizzati con le relative T_m e le dimensioni dell'amplicone per il gene SSTR2.

Gene	Sequenza del primer	Temperatura di annealing	Lunghezza amplicone (bp)
SSTR5 a	5'- gcccaggaggaaggaatg -3' 5'- caggttgagaatgtagatgttg -3'	T _m = 58 °C	349
SSTR5 b	5'- ttgcccaagatgaagacc -3' 5'- ccgtgtagatgatgaagac -3'	T _m = 60°C	415
SSTR5 c	5'- cctgtctctgtgcatgctc -3' 5'- gaggatgaccacgaagaag -3'	T _m = 60°C	382
SSTR5 d	5'- cccttcttcaccgtcaacat -3' 5'- ctaactgccctgtgtctac -3'	T _m = 62°C	465

Tabella 6: Schema riassuntivo dei primers utilizzati con le relative T_m e le dimensioni dell'amplicone per il gene SSTR5

La mix per la reazione di PCR contiene: GeneAmp Gold Buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0.2mM , 0.3µM di ciascun primer, 0.01 unità di AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA).

I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Per identificare il frammento è stato utilizzato il marcatore di peso molecolare 1 KB Plus DNA Ladder (Invitrogen). I prodotti di PCR sono stati visualizzati al transilluminatore UV e le immagini dei gel sono state acquisite con Fluor-S™ Multimager (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Questo ha consentito di ottimizzare la quantità di amplificato da impiegare per l'analisi D-HPLC, in base all'intensità standardizzata della banda del prodotto.

DHPLC

Tra le molte tecniche impiegate per la rilevazione delle mutazioni puntiformi nel DNA, la DHPLC o HPLC denaturante è forse la più rapida ed automatizzabile; inoltre ha una sensibilità superiore al 97%, affermandosi anche come strumento utile non solo a livello diagnostico (cioè per la ricerca di una o

più mutazioni note in una sequenza) ma anche e soprattutto per la ricerca di nuove mutazioni.

Il sistema D-HPLC è una tecnica di cromatografia liquida a scambio ionico in fase inversa. La fase stazionaria della colonna è costituita da copolimeri, non porosi, di polistirene-divinilbenzene (PS-DVB) derivatizzati in superficie con molecole di octadecilsilano (C_{18}). I frammenti di acido nucleico, carichi negativamente per la presenza dei gruppi fosfato, non possono interagire direttamente con la fase stazionaria, che è elettricamente neutra e idrofobica. Un reagente a legame ionico carico positivamente, il trietilammonio acetato (TEAA), permette alle molecole di acido nucleico di interagire con la matrice idrofobica (fig. 9). Il catione ammonio del TEAA interagisce con gli anioni fosfato dell'acido nucleico mentre le catene alchiliche del TEAA interagiscono con la superficie idrofobica della colonna. Più è lungo il frammento di acido nucleico, maggiore è la forza di adsorbimento alla fase stazionaria, perché aumenta il numero di molecole di TEAA che interagiscono con i gruppi fosfato.

L'eluizione dei frammenti di acido nucleico avviene mediante un gradiente lineare del solvente organico acetonitrile nella fase mobile. L'acetonitrile riduce l'interazione idrofobica tra la fase stazionaria e le catene alchiliche delle molecole "ponte" di TEAA. All'uscita dalla colonna i diversi frammenti sono identificati tramite un rivelatore UV impostato con lunghezza d'onda a 260nm: un software produce il grafico dell'assorbanza in funzione del tempo di ritenzione (cromatogramma). Il successivo aumento della concentrazione di acetonitrile rigenera la colonna rimuovendo le varie contaminazioni e la riequilibra per la successiva analisi.

Il sistema DHPLC ha 3 modalità operative:

Non denaturante: per la separazione di frammenti di acidi nucleici basata sulle dimensioni e non sulla sequenza nucleotidica ⁵⁵ ;

Parzialmente denaturante: per l'identificazione di mutazioni puntiformi, delezioni e inserzioni, mediante formazione di eteroduplici ^{56 57};

Completamente denaturante: per la separazione di acidi nucleici a singolo filamento in funzione della sequenza⁵⁸.

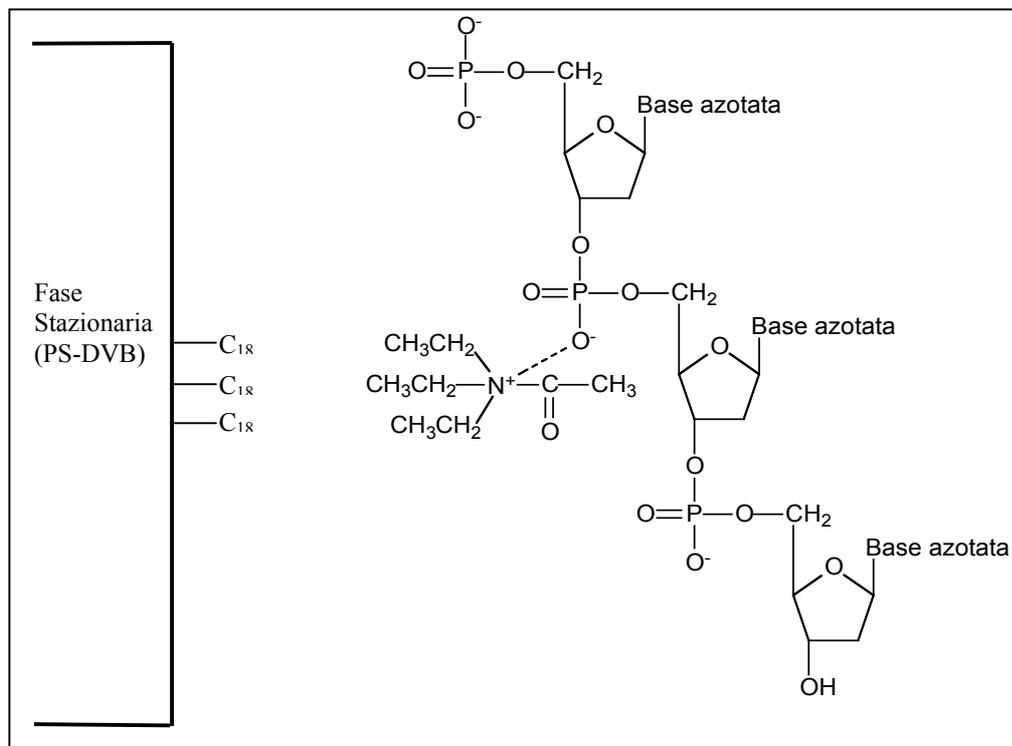


Figura 9: Rappresentazione schematica dell'interazione fra FASE STAZIONARIA - TEAA - DNA.

Lo screening di polimorfismi in condizioni di parziale denaturazione si basa sul diverso tempo di ritenzione. A basse temperature (50°C), omoduplici ed eteroduplici vengono generalmente eluiti agli stessi tempi. All'aumentare della temperatura, il DNA inizia a denaturarsi selettivamente nelle regioni di mismatch degli eteroduplici. In queste condizioni, gli eteroduplici sono eluiti prima degli omoduplici. A temperature ancor più alte, gli omoduplici sono anch'essi denaturati e non risultano più distinguibili dagli eteroduplici.

Sono disponibili due software per la predizione teorica della temperatura di denaturazione: Wavemaker (Transgenomic Inc.) e Melt (disponibile liberamente sul sito web <http://insertion.stanford.edu/melt.html>). Entrambi questi algoritmi predicono la temperatura di denaturazione del prodotto di PCR in base alla

sequenza nucleotidica. Alcuni frammenti di DNA presentano più domini di denaturazione e l'analisi dovrà essere ripetuta a diverse temperature.

Inoltre, è possibile costruire delle curve di melting empiriche graficando il tempo di ritenzione in funzione della temperatura della colonna. La temperatura di colonna ottimale per la risoluzione degli eteroduplici dagli omoduplici viene ottenuta iniettando aliquote di prodotti di PCR a temperature della colonna crescenti (in genere incrementi di 2°C nell'intervallo 50-70°C) finché si verifica una significativa diminuzione del tempo di ritenzione.

Per un'analisi in condizioni ottimali, i frammenti di PCR dovrebbero avere una lunghezza compresa tra 200 e 500bp. Frammenti di dimensioni superiori a 500bp possono essere analizzati ma diminuisce la sensibilità ed aumenta il tempo di ritenzione.

Un vantaggio della metodica è che i prodotti di PCR non devono essere purificati. Infatti, i nucleotidi non incorporati ed i primers eluiscono significativamente in anticipo rispetto al picco del campione, mentre il template ed i contaminanti ad alto peso molecolare eluiscono per ultimi. I dimeri di primers ed i contaminanti con un peso molecolare simile a quello del campione possono tuttavia interferire con l'analisi. Questi contaminanti devono quindi essere eliminati ottimizzando la PCR: una purificazione da gel non è infatti possibile, visto che i reagenti e l'agarosio residuo danneggerebbero la colonna.

La colonna cromatografica è sensibile a molti dei reagenti impiegati durante la PCR. In generale, il tampone di PCR non dovrebbe contenere BSA, formammide, DMSO > 10% e detergenti come Triton e SDS. Inoltre, l'olio minerale danneggia irreversibilmente la colonna. E' dunque buona prassi attenersi a quanto specificato dal produttore del sistema D-HPLC per evitare danni alla colonna.

Per ottenere prodotti di PCR di elevata qualità è consigliabile una DNA polimerasi con attività "proofreading" ed evitare l'impiego di primers marcati con fluorofori o altre molecole. Per "proofreading" si intende un'attività

esonucleasica in direzione 3'-5' che consente alla polimerasi di eliminare e sostituire l'ultimo nucleotide introdotto se non è complementare al template. La polimerasi utilizzata nel nostro studio (Amplitaq Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA) presenta queste caratteristiche.

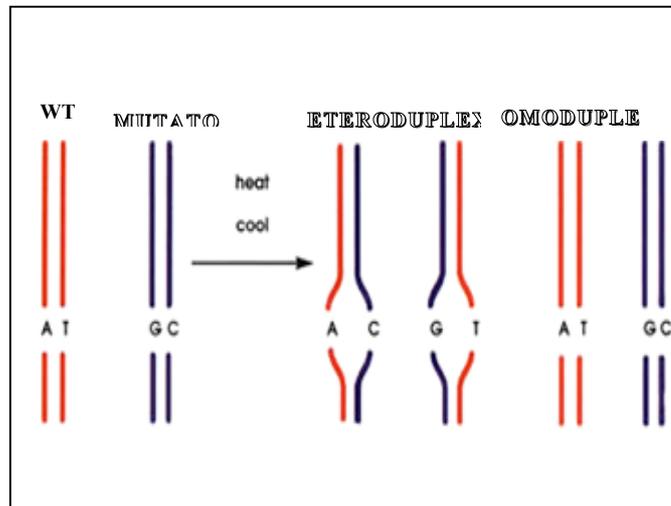
Generalmente 6-8₁ (50-200ng) di prodotto di PCR vengono iniettati nella colonna. I prodotti troppo diluiti producono scarsi risultati a causa di un basso rapporto segnale e rumore di fondo ed è quindi importante mettere a punto una reazione di PCR che dia un prodotto a concentrazione ottimale e che sia altamente ripetibile.

ANALISI IN DHPLC

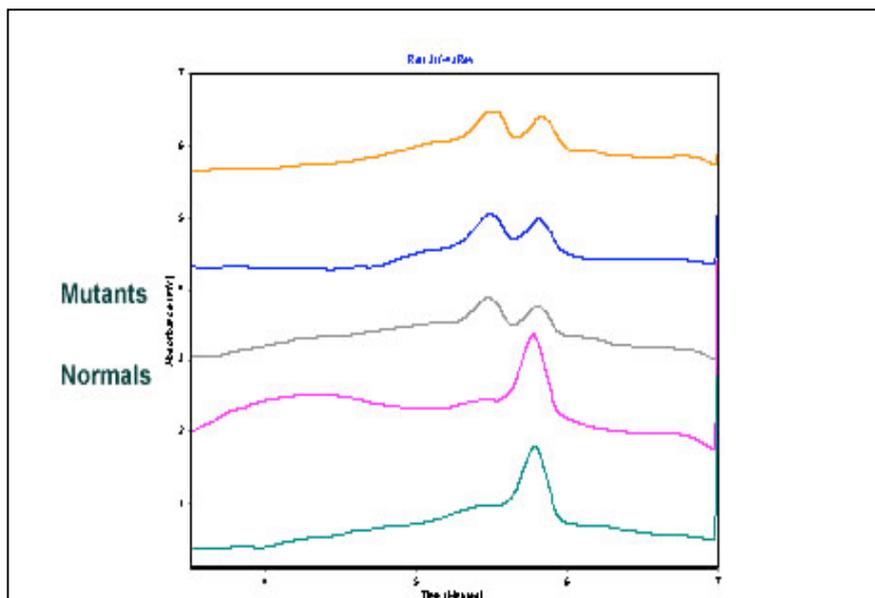
Prima dell'iniezione, i prodotti di PCR vengono denaturati termicamente e poi lasciati gradualmente rinaturare a temperatura ambiente. Se il template per la PCR è eterozigote (un allele mutato ed un allele normale), allora dopo la rinaturazione si avrà la formazione sia di omoduplici sia di eteroduplici. Se, invece, il template è omozigote normale (entrambi gli alleli normali) oppure omozigote per la mutazione (entrambi gli alleli mutati) si avrà esclusivamente la formazione di omoduplici (fig. 10). Questi due stati di omozigosi non possono essere distinti in D-HPLC. Per distinguerli è sufficiente miscelare in rapporto 1:1 il prodotto di PCR con un riferimento sequenziato omozigote normale. A seguito della denaturazione e rinaturazione si formeranno sia omoduplici sia eteroduplici se il prodotto di PCR è omozigote per la mutazione; solo omoduplici se il prodotto è omozigote normale.

Come già accennato l'eteroduplex si comporta cromatograficamente in modo differente dall'omoduplex non mutato, in quanto i tempi di ritenzione sono diversi ed in particolare l'eteroduplex è più veloce. La presenza di mutazione si evidenzia sotto forma di picchi ulteriori rispetto al "wild", ed il grande

vantaggio per il ricercatore è quello di rivelare la mutazione all'interno del frammento analizzato.



A



B

Figura 10: A: **Formazione di omoduplici ed eteroduplici in seguito ai processi di denaturazione e rinaturazione dei prodotti di PCR**; B: **Esempi di cromatogrammi mutati e normali.**

E' consigliabile includere nell'analisi un controllo normale, già sequenziato, che permetta di individuare la presenza di una mutazione per semplice confronto

dei profili d'eluizione. L'esatta posizione e la natura dell'alterazione devono essere successivamente determinate mediante sequenziamento.

SEQUENZIAMENTO FRAMMENTI POLIMORFICI

La purificazione dei prodotti di PCR è necessaria per eliminare l'eccesso di primers e dNTPs, che potrebbe innescare reazioni di sequenza di secondaria importanza. Queste reazioni riducono infatti l'efficienza del segnale relativo alla sequenza ricercata, determinando un forte incremento del background, che ne rende difficile se non impossibile la lettura. La purificazione dei prodotti di PCR e dei prodotti di sequenza è stata eseguita utilizzando il kit SEQ-PREP GD-400 (GeneDia, Lucca, Italia).

In ciascuna provetta da 0.5ml si aliquotando 20 μ l di P-PUR Solution (mantenuta a 4°C) e 20 μ l di prodotto di PCR. Dopo agitazione su vortex, si incuba a 37°C per 10 minuti, quindi si centrifuga a 14000 g per 10 minuti. In seguito si elimina il supernatante per decantazione e si asciuga l'imboccatura della provetta con carta assorbente. Dopo aggiunta di 200 μ l di WASH Solution (tenuta a -20°C), si centrifuga a 14000 g per 5 minuti, avendo cura di posizionare le provette in centrifuga sempre con lo stesso orientamento, per evitare di muovere il pellet di DNA, che non è visibile in questa fase. In seguito si elimina il supernatante per decantazione e si asciuga l'imboccatura della provetta con carta assorbente. Si ripete una seconda volta il procedimento, quindi si asciuga il pellet di DNA all'aria mantenendo le provette capovolte e si risospende il pellet di DNA in 20 μ l di H₂O sterile. Per determinare la quantità e qualità del DNA da utilizzare come template nella reazione di sequenza, si utilizza l'elettroforesi su gel di agarosio.

La concentrazione dei prodotti di PCR così purificati è stata stimata confrontando l'intensità delle bande ottenute dopo aver caricato 5 μ l di ogni

prodotto in un gel di agarosio al 2% e quella delle bande prodotte da diluizioni scalari di DNA a concentrazione nota (Marker VIII, Roche).

Il prodotto purificato è utilizzato per la PCR di sequenza che viene realizzata utilizzando il CEQ-Dye Terminator Cycle Sequencing-quick start kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA) nel termociclatore Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). La PCR viene eseguita in un volume finale di 20 μ l, con 8 μ l di una miscela contenente Sequencing Reaction Buffer, DNA Polimerasi, dNTPs mix, 2 μ l di primer di sequenza (forward o reverse) alla concentrazione di 1.6 μ M ed il template (50fmol).

Il profilo termico della PCR di sequenza è stato il seguente: primo step a 96° per 20 sec, 30 cicli a 50° per 20 s e 60° per 4 min.

Il prodotto di PCR così ottenuto viene purificato utilizzando il seguente metodo: per ciascun campione si prepara la Master mix che consiste di 2 μ l di Stop solution A (4°C), 2 μ l di Stop solution B (4°C) e 1 μ l di Carrier (-20°C). Si aggiungono 20 μ l del prodotto di PCR di sequenza e 60 μ l di Precipitation Solution (tenuta a -20°C) quindi si agita su vortex e si centrifuga a 12000 g per 10 minuti. Si elimina il sovrantante e si aggiungono al pellet 200 μ l di WASH Solution (tenuta a -20°C); quindi si centrifuga a 12.000 g per 5 minuti. Si ripete l'operazione per altre due volte. Si asciuga il pellet di DNA all'aria per almeno 15 minuti e si risospende il pellet di DNA in 40 μ l di Resuspension Solution (scongelata immediatamente prima dell'uso); quindi si agitano le provette su vortex e si incubano a 20°C, al buio, per 10 minuti. In seguito le provette vengono agitate nuovamente e incubate a 20°C, al buio, per 30 minuti. Si aliquotano i 40 μ l così ottenuti in una piastra per campioni e si ricoprono con olio minerale. La piastra viene congelata fino al momento del caricamento sul sequenziatore automatico CEQ™8000 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA).

RISULTATI ADENOMI IPOFISARI

ESPRESSIONE DEI RECETTORI DELLA SOMATOSTATINA

I risultati da noi in possesso riguardano l'espressione dei recettori della SST (di tipo 1, 2, 3, 5) in 16 adenomi ipofisari e in due anteroipofisi umane normali.

#	Tipo	SSTR1 pg / μ g RNA totale	SSTR2 pg / μ g RNA totale	SSTR3 pg / μ g RNA totale	SSTR5 pg / μ g RNA totale
NP1	Pituitary	3380	22000	147400	39840
NP2	Pituitary	20600	264000	n.d.	74640
A1	ACRO	6940	6400	8880	15520
A4	ACRO	0	6600	1508	13760
A5	ACRO	0	10600	1246	4600
A7	ACRO	0	2380	2140	154
C1	CUSH	115	4480	16620	16960
C2	CUSH	109	9660	12300	5680
C3	CUSH	21	532	6080	1416
N4	NFPA	0	568	218	592
N5	NFPA	0	2920	1240	0
N6	NFPA	8	35800	20400	77
N7	NFPA	10	4660	3480	0
N9	NFPA	3	922	n.d.	81
N10	NFPA	69	2920	224000	1742
N11	NFPA	18	1660	58800	144
N14	NFPA	57	2820	49200	65
N15	NFPA	115	81000	128800	16580

Tabella 7: Livello di espressione dell'mRNA di SSTR1, 2, 3, 5 in 2 ghiandole ipofisarie normali (NP1 e NP2) e in 16 adenomi ipofisari, determinati con il metodo quantitativo di PCR-Real Time. I valori sono espressi come pg di equivalenti di CHP404/ μ g di RNA totale per SSTR2 e pg di equivalenti di CHO[-SSTR1, 3, o 5]/ μ g di RNA totale per SSTR1, 3, e 5 rispettivamente. n.d. sta per non determinato.

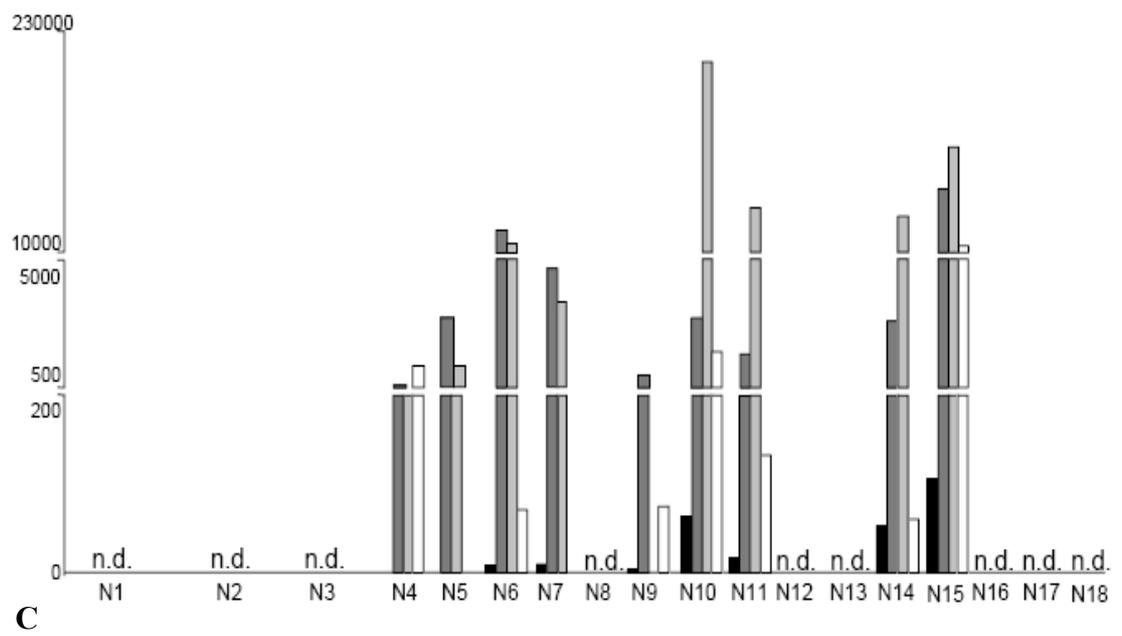
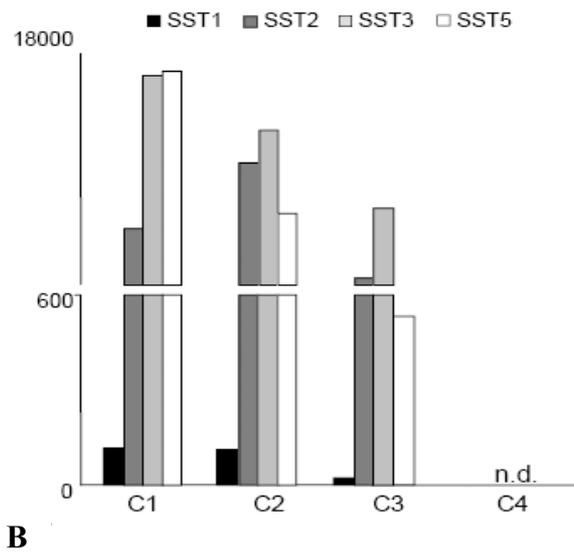
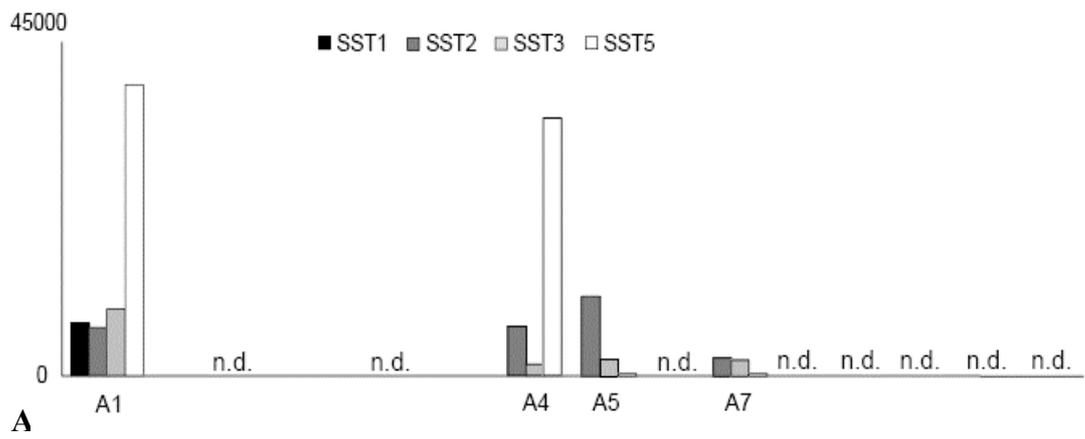


Figura 11: **Mostra il livello dei trascritti di SSTR1, 2, 3 e 5 in alcuni degli adenomi ipofisari esaminati. In A. per gli ACRO, in B. per i CUSH e in C. per i NFPA.**

Tutti e 4 i tipi di recettore sono stati trovati nelle due anteroipofisi normali esaminate.

SSTR1 è il recettore con il più basso livello di mRNA, seguito da SSTR5, mentre SSTR2 e 3 presentano il più alto livello di espressione.

16 dei 34 adenomi ipofisari elencati nella tabella 6 sono stati inclusi in questo studio (4 ACRO, 3 CUSH, 9 NFPA). Tutti e 16 i tumori studiati esprimono almeno un tipo di SSTR (Tabella 6 e fig. 11).

SSTR1 è stato trovato solo in 1 ACRO, in tutti e 3 i CUSH, e in molti NFPA (7 su 9).

Gran parte degli adenomi ipofisari esprimono SSTR2 e non c'è una significativa differenza di espressione tra i diversi tipi di tumore.

Sorprendentemente l'espressione di SSTR3 è alta in quasi tutti i tumori esaminati. Comunque, in gran parte del gruppo degli NFPA l'mRNA che codifica per questo recettore è più alto che negli ACRO.

SSTR5, infine, è espresso in elevate quantità nei tumori GH- e ACTH-secerenti, mentre non è espresso, se non in minima parte, negli adenomi non funzionanti.

EFFETTO DI SOM230 VS. OCTREOTIDE SULLA SECREZIONE ORMONALE

La secrezione ormonale è stata valutata in 9 adenomi ipofisari (6 ACRO, 3 CUSH).

I risultati sono presentati in figura 12.

Il trattamento con 1 μ M SOM230 per 24h diminuisce significativamente ($P<0.05$) la secrezione di GH in tutti 6 casi di ACRO (fig. 12A), mentre 1 μ M di octreotide è efficace in 2 su 6 tumori (A1 e A5).

Soltanto in due casi il numero delle cellule ci ha permesso di valutare l'effetto di differenti concentrazioni di SOM230 e la concentrazione 100nM di SOM230 è capace di diminuire significativamente la secrezione di GH in un solo caso (A4) e non è efficace negli altri casi (fig. 12A).

Il potenziale effetto di SOM230 di diminuire la secrezione di ACTH nei CUSH è stato determinato in 3 tumori in coltura (fig. 12B). Nel primo caso (C1) sia il SOM230 sia l'octreotide riducono significativamente ($P<0.005$) il rilascio di ACTH del 30% e del 20% rispettivamente, mentre nel secondo caso (C3) non ha risposto per entrambi i composti (Fig. 2D). Il terzo CUSH testato (C4) risponde a SOM230 in modo significativo ($P<0.005$) ma non all'octreotide.

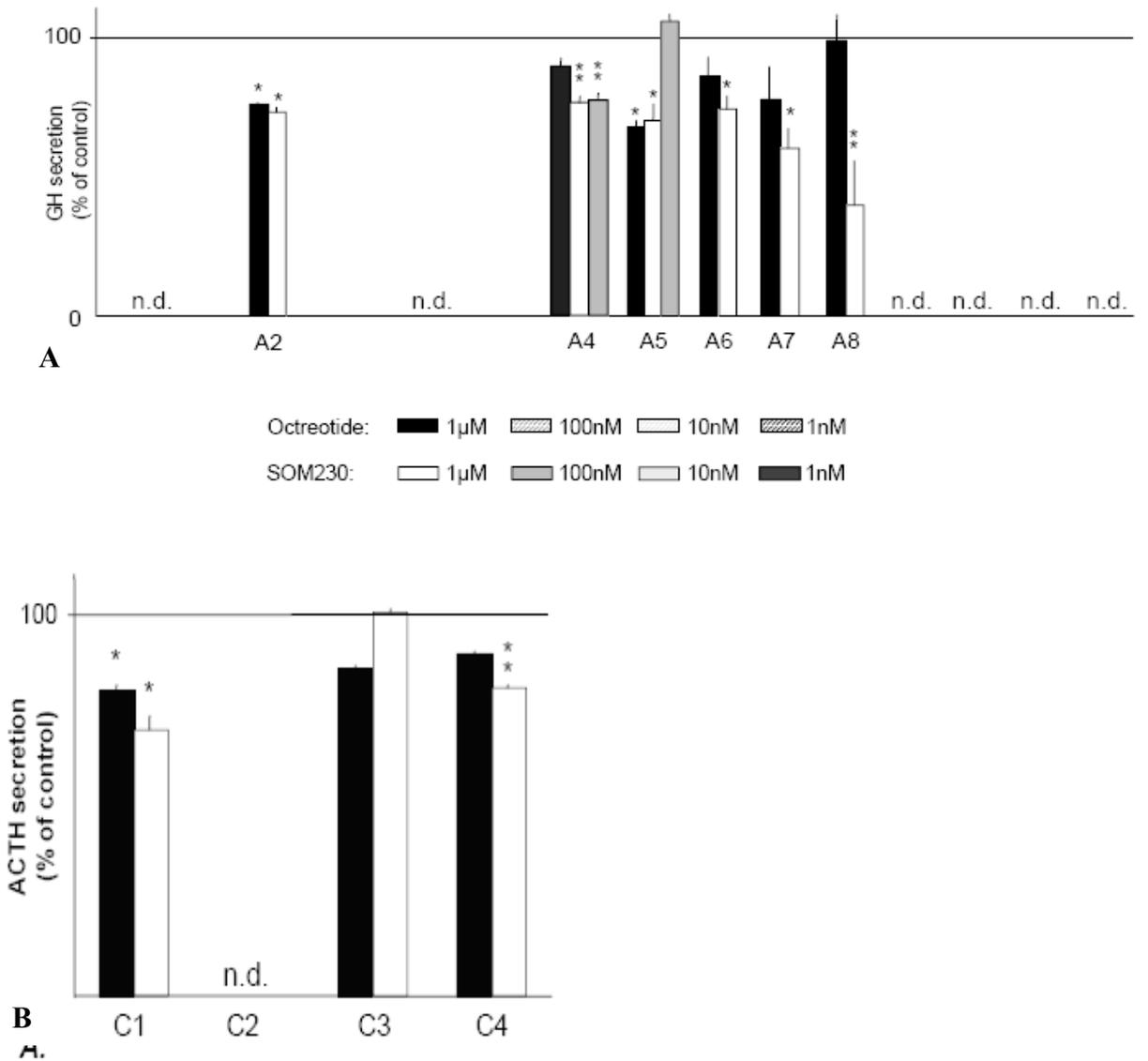
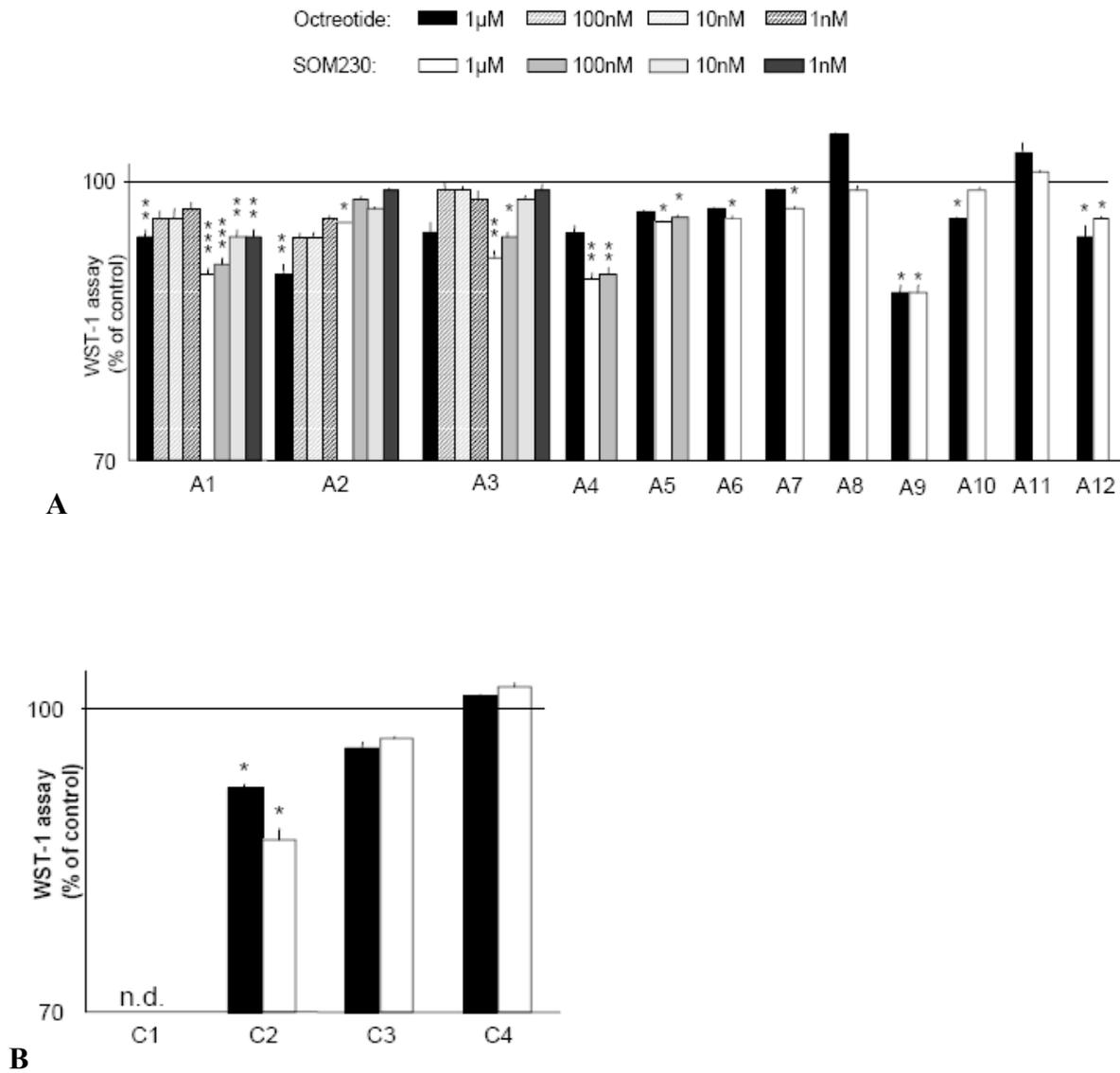


Figura 12: A: Effetto di octreotide e SOM230 sulla secrezione di GH in 12 ACRO dopo 24h di trattamento con 1µM di ciascun analogo. A 1-3 sono stati trattati anche con 100nM, 10nM e 1nM di octreotide e SOM230. B: Secrezione di ACTH in 4 CUSH trattati con 1µM di octreotide (in nero) e 1µM di SOM230 (in bianco) per 24h. I valori sono espressi come percentuale sul controllo; * P<0.05, ** P<0.005 and *** P<0.001.

EFFETTO DI SOM230 VS. OCTREOTIDE SULLA VITALITA' CELLULARE

La vitalità cellulare è stata valutata in 33 adenomi ipofisari (12 ACRO, 3CUSH, 18 NFPA).

I risultati sono presentati in figura 13.



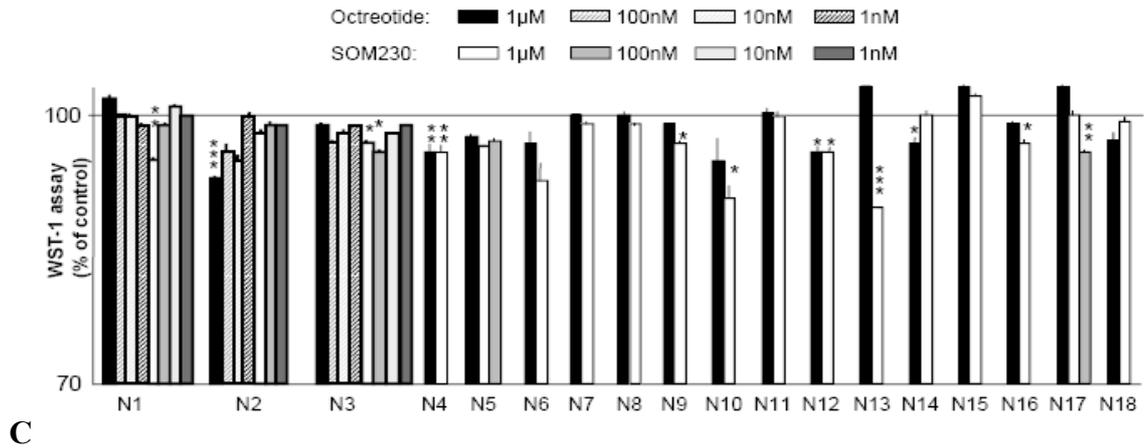


Figura 13: Effetto di octreotide e SOM230 sulla vitalità cellulare dopo 24h di trattamento in ACRO (A), CUSH (B) e NFPA (C). A1-3 sono stati trattati anche con 100nM, 10nM e 1nM di octreotide e SOM 230. I valori sono espressi come percentuale sui controlli; * P<0.05, ** P<0.005 e *** P<0.01.

La concentrazione 1µM di SOM230 è efficace in 9 ACRO (A1: P<0.001; A2-7, A9 e A12: P<0.05 e P<0.005; fig. 13A), mentre l'octreotide alla stessa concentrazione diminuisce la vitalità cellulare in 5 tumori (A1, A2: P<0.005; A9, A10 e A12: P<0.05; fig. 13A). E' interessante osservare che entrambi gli analoghi hanno avuto lo stesso effetto in 5 tumori, mentre altri 4 adenomi erano responsivi in termini di proliferazione cellulare solo al SOM230.

In alcuni tumori (A1, A2 e A3) le cellule coltivate sono state sufficienti per effettuare uno studio dose risposta. In questi neoplasmi l'octreotide è stato efficace solo alla concentrazione di 1µM, mentre SOM230 ha diminuito in modo significativo la vitalità cellulare alla concentrazione di 100nM (A1 e A2: P<0.001 e P<0.05 rispettivamente; fig. 13A), 10nM (A1: P<0.05) e 1nM (A1: P<0.05). SOM230 100nM è stato testato in altri due casi (A4, A5) ed ha mostrato un effetto significativo sulla proliferazione cellulare (P<0.005: P<0.05 rispettivamente). Solo 1 ACRO ha risposto ad octreotide (A10) e 2 casi non hanno risposto ad entrambi gli analoghi (A8 e A11).

Nei tre CUSH testati il test WST-1 non ha mostrato un'azione antiproliferativa alla concentrazione di 1 μ M in due casi (C3, C4), mentre nel terzo (C2) entrambi gli analoghi diminuiscono la vitalità cellulare (P<0.05; fig. 13B).

Considerando tutti i casi di NFPA, 1 μ M di SOM230 è stato efficace in 8 casi (N1: P<0.005; N3, N4, N9, N10, N12, N13, e N16: P<0.05; fig. 13C), mentre l'octreotide alla stessa concentrazione diminuisce la vitalità cellulare in 4 casi (N2, N4, N12, e N14: P<0.05). 6 NFPA rispondono in modo interessante solo al SOM230 (N1, N3, N9, N10, N13, N16: P<0.05), mentre 2 rispondono all'octreotide (N2: P<0.001, N14: P<0.05). 7 NFPA non rispondono al trattamento di nessun analogo. Studi di dose risposta effettuati per tre tumori dimostrano una diminuzione della vitalità cellulare in un caso dopo il trattamento con 1 μ M di SOM230 (P<0.005) e in un secondo caso (N2) dopo il trattamento con 1 μ M di octreotide (P<0.001). Il terzo caso (N3) risponde sia alla concentrazione di 1 μ M che alla concentrazione di 100nM di SOM230 (P<0.05), ma non alle varie concentrazioni di octreotide. E' da osservare che un caso non risponde a SOM230 1 μ M ma alla concentrazione di 100nM (N17: P<0.005), inoltre SOM230 100nm è stato testato in altri 3 NFPA senza cambiamenti significativi nella proliferazione cellulare.

CONFRONTO TRA L'ESPRESSIONE DI SSTR E L'EFFETTO DI SOM230 E DI OCTREOTIDE

La determinazione di SSTR è stata possibile in 4 su 12 ACRO trattati con octreotide e SOM230 (fig. 11A). Tutti e 4 i casi esprimono SSTR2, 3 e 5 a livelli variabili, e in un caso solo (A1) SSTR1 a livelli elevati. Di questi casi, 3 sono stati valutati secernere GH. Tutti e 3 i casi hanno risposto a SOM230, mentre uno solo ad octreotide. L'unico tumore responsivo ad octreotide in termini di secrezione presenta i più alti livelli di espressione di SSTR2 in questa sottoclasse di neoplasmi (A5; fig. 11A e 12A).

In termini di proliferazione, la presenza dell'espressione di più di un SSTR può spiegare la risposta di tutti questi 4 casi all'effetto antiproliferativo del SOM230. Inoltre l'elevata espressione di SSTR2 e 5 potrebbe spiegare l'effetto antiproliferativo di octreotide in A1 e A4, anche se in A4 l'effetto di octreotide potrebbe non raggiungere la significatività statistica.

In tutti e 3 i CUSH testati per l'espressione di SSTR, l'mRNA di SSTR2, 3 e 5 presenta livelli variabili (fig. 11B). In C1 l'espressione degli SSTR spiega l'effetto antisecretorio e antiproliferativo di entrambi gli analoghi, mentre la mancanza di risposta in C3 può essere attribuita ai livelli bassi di espressione di SSTR2 e SSTR5.

Negli NFPA il livello di espressione degli SSTR è stato determinato in 9 casi su 18. La presenza di SSTR2, 3 e 5 riflette l'effetto antiproliferativo di SOM230 in 3 tumori (N4, N9 e N10). Comunque in 4 adenomi (N6, N11, N14 e N15), nonostante l'elevata espressione di SSTR2, 3 e 5 (fig. 11C) il SOM230 non ha avuto alcun effetto. Gli unici 2 NFPA che hanno risposto in termini di proliferazione cellulare all'octreotide (N4 e N14), per i quali è stata valutata l'espressione degli SSTR, non hanno mostrato alcuna correlazione tra l'espressione di SSTR e l'effetto antiproliferativo.

ANALISI MOLECOLARE DEL DNA GENOMICO

Nella tabella sottostante sono rappresentati i campioni selezionati per l'analisi molecolare del DNA genomico con DHPLC e sequenziamento, che esprimono SSTR2 e/o SSTR5, ma che sono resistenti al trattamento farmacologico.

In questo studio è stato incluso anche il campione N6 che presenta un livello di mRNA basso di SSTR2 e 5 e che risponde al trattamento con i farmaci, poichè le biopsie tumorali stoccate a -80°C appartenenti ad alcuni campioni interessanti, erano ormai esaurite al momento della selezione per lo studio genetico.

Caso #	Tipo	SSTR2 pg / μg RNA tot	SSTR5 pg / μg RNA tot	Risposta a Octreotide	Risposta a SOM
N2	NFPA	2920	0	no	no
N3*	NFPA	35800	77	no	no
N4*	NFPA	4660	0	no	no
N6	NFPA	922	81	si	si
N7*	NFPA	2920	1742	no	si

Tabella 8: Elenco dei campioni utilizzati per l'analisi molecolare, dove sono riportati il livello di espressione dell'mRNA di SSTR2 e 5 e la risposta agli analoghi della somatostatina. *campioni nei quali è stata eseguita l'analisi di mutazione sia sul tessuto che sul sangue

L'analisi D-HPLC ha consentito di evidenziare alcune variazioni sia a carico di SSTR2, che di SSTR5. Al successivo sequenziamento, sono stati trovati alcuni polimorfismi, riassunti nella tabella sottostante.

Caso #	polimorfismi SSTR2	polimorfismi SSTR5
N2	<i>g.</i> 5542 A>G	Pro335Leu
N3	wt	LOH
N4	<i>repeat TG</i>	<i>Pro335Leu</i>
N6	wt	Leu145Leu
N7	wt	<i>Leu48Met</i>

Tabella 9: Polimorfismi riscontrati in seguito ad analisi D-HPLC e sequenziamento. In corsivo sono riportate le mutazioni germinali, trovate sia nel sangue che nel tessuto tumorale del paziente. "g." sta per sequenza genomica di riferimento.

Polimorfismi a carico del gene SSTR2: l'analisi DHPLC con successivo sequenziamento ha mostrato nell'esone 1 del campione N4, che esprime SSTR2 ma che non risponde ai farmaci, un TG-dinucleotide tandem repeat, sia nel sangue che nel tessuto tumorale del paziente.

Nel campione N2, che esprime a livelli bassi SSTR2 ma che non risponde ai farmaci, è stata trovata la sostituzione A>G nel nucleotide 5542 (cDNA 1602) situato nel 3' UTR (133 nucleotidi dopo il codone terminatore).

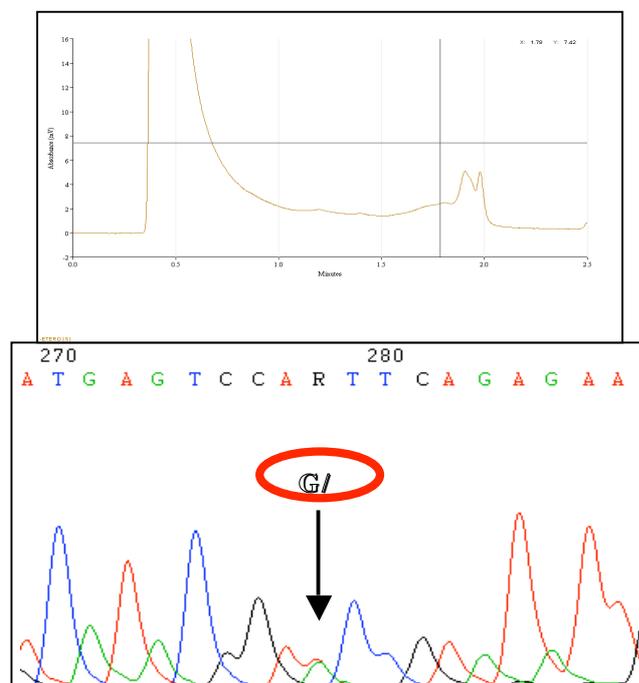


Figura 14: Cromatogrammi del polimorfismo g. 5542 A>G in D-HPLC (sopra) e al sequenziatore (sotto).

Polimorfismi a carico del gene SSTR5: l'analisi D-HPLC con successivo sequenziamento ha permesso di individuare due mutazioni missenso già descritte in letteratura e una mutazione silente non descritta. Più precisamente a carico del campione N7, che esprime SSTR2 e SSTR5 ma che non risponde al trattamento con octreotide, abbiamo trovato la mutazione missenso Leu48Met. Questa è una mutazione germinale, in quanto è stata trovata anche nel sangue del paziente.

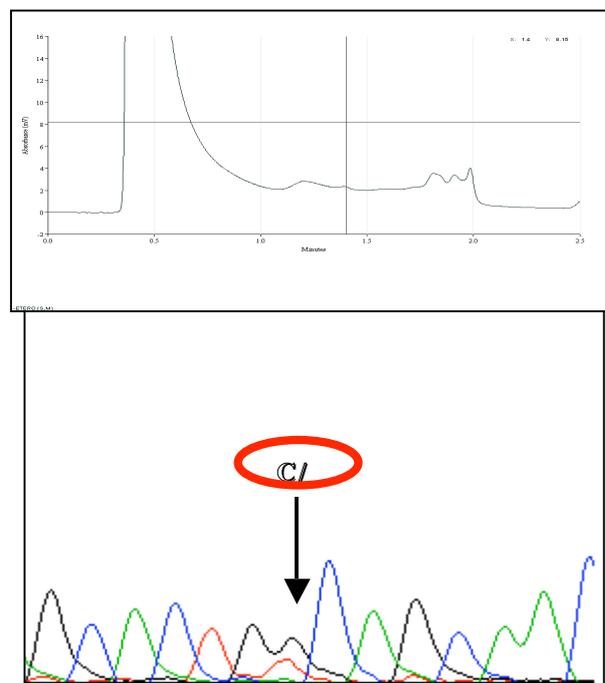


Figura 15: Cromatogrammi del polimorfismo Leu48Met in D-HPLC (sopra) e al sequenziatore (sotto).

Nei campioni N2 e N4, che non esprimono SSTR5 e non rispondono al trattamento coi farmaci, è stata trovata la mutazione missenso Pro335Leu. Avendo a disposizione il sangue del paziente N4, abbiamo trovato che la mutazione Pro335Leu anche in questo caso è germinale.

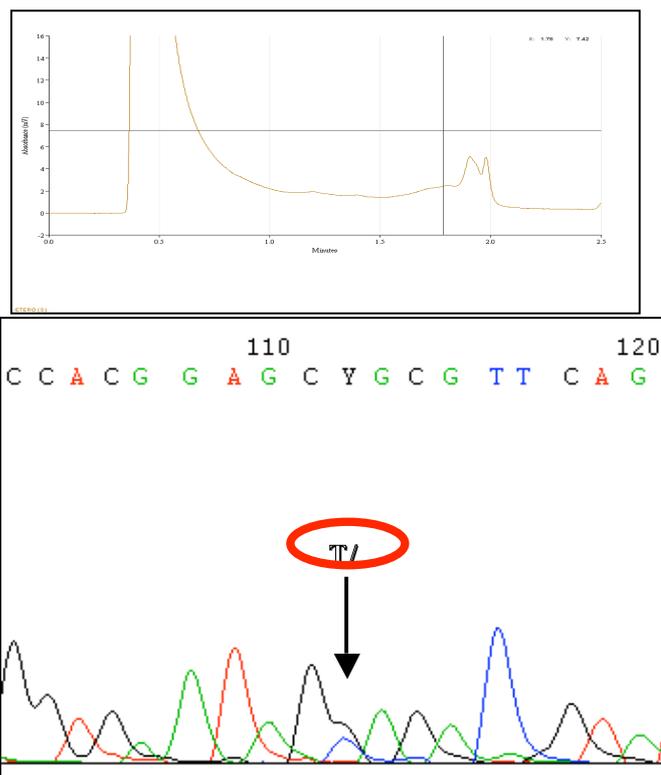


Figura 16: Cromatogrammi del polimorfismo Pro335Leu in D-HPLC (sopra) e al sequenziatore (sotto).

Nel campione N6, che ha livelli di mRNA di SSTR2 e 5 bassi, e che risponde al trattamento coi farmaci, è stata trovata la mutazione silente Leu145Leu.

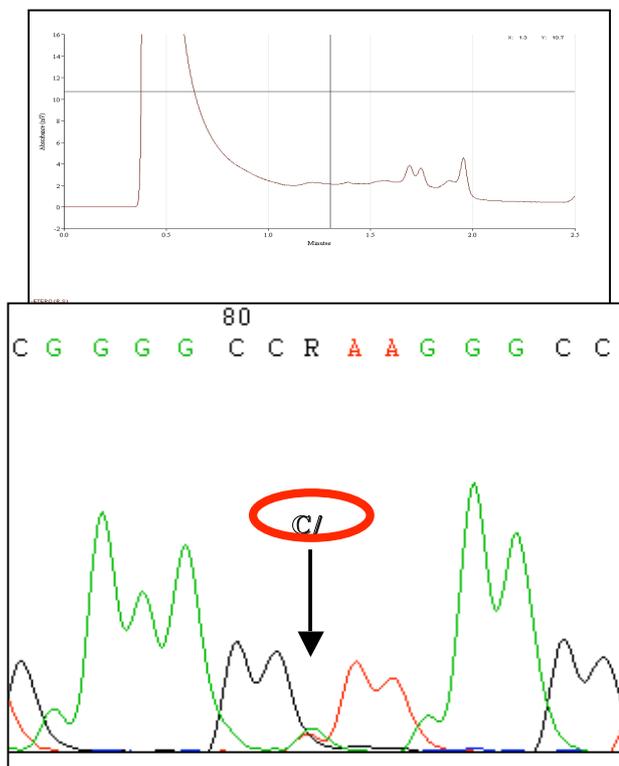


Figura 17: Cromatogrammi del polimorfismo Leu145Leu in D-HPLC (sopra) e al sequenziatore (sotto).

La mutazione più interessante trovata è una perdita di eterozigosi (LOH= Loss of Heterozygosity) nel locus del gene SSTR5 con la ritenzione delle varianti 52Val e 335L nel campione N3, che esprime in elevate quantità SSTR2, a livelli molti bassi SSTR5, e non risponde ai farmaci.

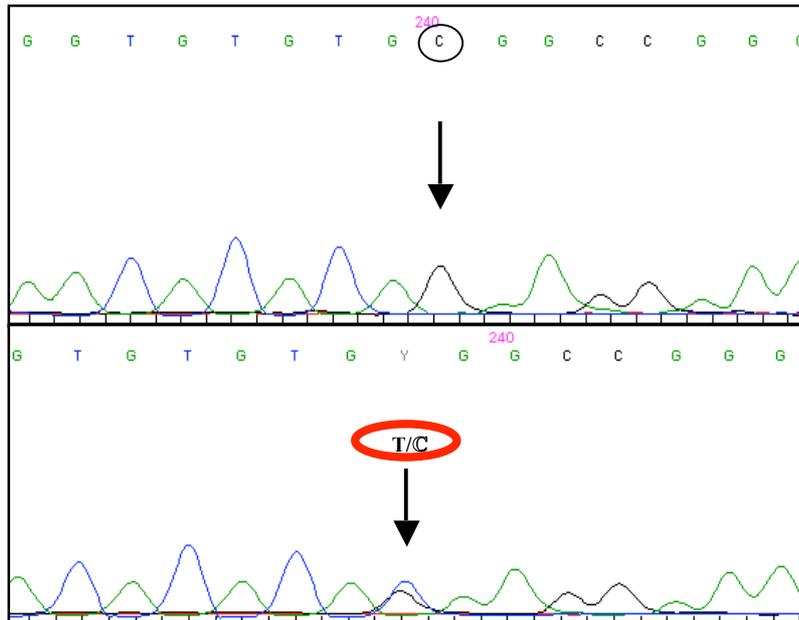


Figura 18: Cromatogrammi del sequenziatore che rappresentano la perdita di eterozigoti nel locus del gene SSTR5, con la ritenzione della variante 52 Val (unico allele C) nel campione di tessuto tumorale (sopra) e il campione di sangue (sotto) eterozigote per il polimorfismo Ala52Val (due alleli T/C).

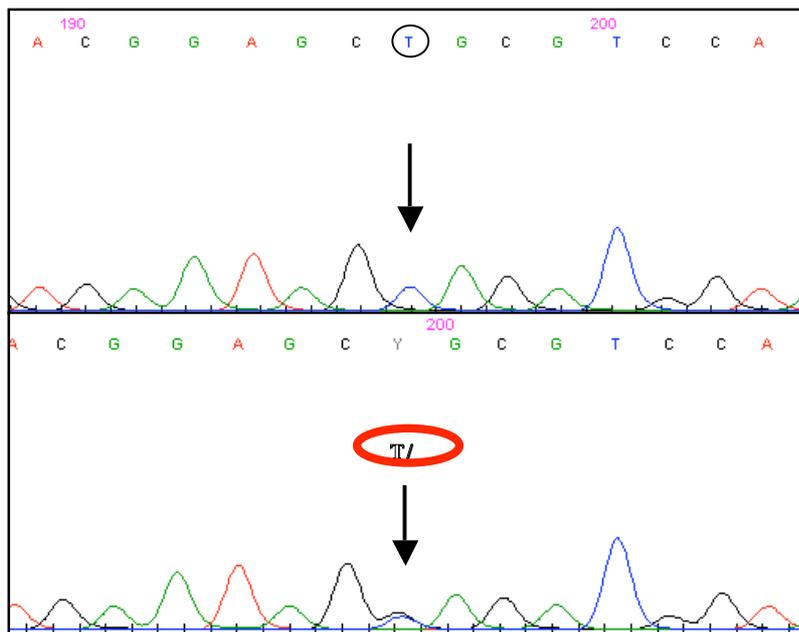


Figura 19: Cromatogrammi del sequenziatore che rappresentano la perdita di eterozigoti nel locus del gene SSTR5, con la ritenzione della variante 335 Leu (unico allele T) nel campione di tessuto tumorale (sopra) e il campione di sangue (sotto) eterozigote per il polimorfismo Pro335Leu (due alleli T/C).

RISULTATI TUMORI GASTRO-ENTERO-PANCREATICI

I risultati da noi in possesso riguardano l'espressione di tutti e 4 i sottotipi recettoriali (SSTR1, 2, 3 e 5) in 20 tumori gastro-entero-pancreatici e in due anteroipofisi umane normali.

#	Tipo	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR5
		pg / μ g RNA totale			
NP1	Ipofisi normale	3380	22000	147400	39840
NP2	Ipofisi normale	20600	264000	ND	74640
P1	VIPoma	2200	167.600	14320	8540
P2	Insulinoma*	9640	10.180	148000	2240
P3	Insulinoma	17640	894000	102600	40000
P4	Gastrinoma	5200	74200	1002	20800
P5	Carcinoide del pancreas	33800	824000	14860	17640
P6	Carcinoide del pancreas	137000	2340000	17620	87600
P7	Ca. ben differenziato	17020	296.000	195000	5360
P8	Ca. scarsamente differenziato	3800	28400	2180	n.e.
P9	Ca. scarsamente differenziato	121	3860	746	114
P10	Ca. ben differenziato	30800	996000	1406	312000
GI1	Gastrinoma*	13820	770000	n.e.	29000
GI2	Somatostatinoma	13020	28600	20600	21200
GI3	Ca. ben differenziato	10320	664000	168	56800
GI4	Ca. ben differenziato	4500	218000	n.e.	11240
GI5	Ca. ben differenziato	7200	404000	n.e.	12680
GI6	Ca. ben differenziato	11360	232000	19420	62800
GI7	Ca. ben differenziato	19520	476000	484	25000
GI8	Ca. ben differenziato	24400	2660000	39000	29200
GI9	Tumore ben differenziato*	3640	174200	1434	3000
GI10	Ca. ben differenziato	2340	72200	3100	3620

Tabella 10: Livello di espressione dell'mRNA di SSTR1, 2, 3, 5 in 2 ghiandole ipofisarie normali (NP1 e NP2) e in 20 tumori gastro-entero-pancreatici, determinati con il metodo quantitativo di PCR-Real Time. I valori sono espressi come pg di equivalenti di CHP404/ μ g di RNA totale per SSTR2 e pg di equivalenti di CHO[-SSTR1, 3, o 5] / μ g di RNA totale per SSTR1, 3, e 5 rispettivamente.

Abbiamo trovato che SSTR2 e SSTR5 è espresso a livelli medio alti in tutti i tumori presi in esame, tranne che nei carcinomi scarsamente differenziati dove il valore del recettore è basso.

Questi dati sono confermati da Octreoscan (vedi tabelle 2, 11 e 12), esame scintigrafico eseguito su tutte le patologie tranne che sui campioni GI1

(gastrinoma duodeno), GI2 (somatostatinoma), GI9 e GI10 (tumori ben differenziati dello stomaco), che correla perfettamente con l'espressione di SSTR2 (P=0.006) e SSTR5 (P=0.004).

SSTR1 presenta un livello medio-basso di espressione in tutte le neoplasie gastro-entero-pancreatiche prese in esame, tranne che nel VIPoma, nel carcinoma ben differenziato dello stomaco (GI10) e nei carcinomi scarsamente differenziati, dove il suo valore è più basso.

SSTR3 è espresso ad alti livelli negli insulinomi e nel carcinoma ben differenziato del pancreas (P7). E' espresso mediamente nel VIPoma (P1) nei carcinoidi del pancreas (P5 e P6), nel Somatostatinoma (GI2) e in due dei carcinoidi ben differenziati dell'ileo (GI6 e GI8). In tutti gli altri campioni tumorali non è espresso e precisamente nei carcinomi scarsamente differenziati, nel carcinoma gastrico dello stomaco (GI9), nei gastrinomi (P4 e GI1) e in 6 su 9 dei tumori ben differenziati.

Qui di seguito, nella tabella 11, sono riportati i valori di media e deviazione standard dell'mRNA dei recettori della somatostatina dei tumori gastro-entero-pancreatici, suddivisi per sesso, istologico, sede del tumore, Octreoscan e stato della malattia a 12 mesi, mentre nella tabella 12 sono indicati i valori di significatività che risultano confrontando i diversi gruppi.

Non c'è correlazione significativa tra l'espressione dei recettori della somatostatina e il sesso.

Per quel che riguarda la correlazione con l'esame istologico, mettendo a confronto i tumori ben differenziati con i tumori scarsamente differenziati (B. dif. vs S. dif.) per l'espressione dei recettori, c'è una differenza significativa tra i due gruppi per l'espressione di SSTR1 (P=0.06), di SSTR2 (P=0.005), di SSTR5 (P<0.001), mentre per l'espressione di SSTR3 non c'è differenza significativa tra i due gruppi, ma tra i tumori ben differenziati e gli insulinomi (B. dif. vs Insul., P=0.038).

E' stata trovata una differenza significativa tra l'espressione di SSTR3 nei tumori del pancreas vs intestino ($P < 0.05$).

Interessante è la correlazione tra l'espressione dei recettori e lo stato della malattia a 12 mesi: c'è differenza significativa per l'espressione di SSTR1 tra i pazienti liberi da malattia e quelli con malattia in progressione (DF vs PD, $P = 0.031$) e tra i pazienti con malattia stabile e quelli con malattia in progressione (SD vs PD, $P = 0.012$). Per l'espressione di SSTR2 c'è differenza significativa tra SD vs PD ($P = 0.015$) e per l'espressione di SSTR5 è significativa la differenza tra DF vs PD ($P = 0.016$) e tra SD vs PD ($P = 0.026$).

In ultimo, il parametro di proliferazione cellulare Ki67, che ci dà informazioni sullo stato di differenziamento cellulare del tumore, correla con l'espressione di SSTR5 ($P = 0.001$) ma non con l'espressione degli altri sottotipi recettoriali.

	Pazienti	SSTR1 (pg / μ g RNA totale)	SSTR2 (pg / μ g RNA totale)	SSTR3 (pg / μ g RNA totale)	SSTR5 (pg / μ g RNA totale)
	N. di casi	(media \pm DS)	(media \pm DS)	(media \pm DS)	(media \pm DS)
Totale	20				
Sesso					
Femmine	11	18367 \pm 29484	566662 \pm 735662	29112 \pm 54572	37447 \pm 68699
Maschi	9	14516 \pm 11845	433400 \pm 349312	24165 \pm 64231	47518 \pm 99630
Istologico					
Ben differenziato	16	21009 \pm 32438	649800 \pm 780977	20545 \pm 47851	44155 \pm 75240
Scarsamente differenziato	2	1961 \pm 2601	16130 \pm 17352	1463 \pm 1014	107 \pm 10
Insulinoma	2	13640 \pm 5657	452090 \pm 624955	125300 \pm 32103	21120 \pm 26700
Sede tumore					
Pancreas	10	25722 \pm 40803	563424 \pm 737375	49773 \pm 71823	49439 \pm 96047
Intestino	10	11012 \pm 7076	569900 \pm 773811	8451 \pm 13418	25454 \pm 20462
Octreoscan					
positivo	12	25277 \pm 36679	779317 \pm 852132	25290 \pm 54762	54138 \pm 85081
negativo	4	7800 \pm 7642	234110 \pm 440050	63382 \pm 73863	10614 \pm 19617
Stato della malattia a 12 mesi					
DF	9	14374 \pm 11156	467376 \pm 384856	33573 \pm 53781	53593 \pm 98391
SD	7	31514 \pm 47107	970057 \pm 1072930	36377 \pm 71410	28566 \pm 28139
PD	4	4405 \pm 4877	84115 \pm 102562	6362 \pm 8759	16659 \pm 30806

Tabella 11: Nella tabella sono riportati i valori di media e deviazione standard (SD) dei trascritti di SSTR1, 2, 3, 5 nei tumori gastro-entero-pancreatici.

	P (SSTR1)	P (SSTR2)	P (SSTR3)	P (SSTR5)
Sesso	0,711	0,450	0,208	0,529
Istologico	0,018	0,014	0,092	<0,001
B. dif. vs S. dif.	0,006	0,005	0,675	<0,001
B. dif. vs Isul.	0,878	0,255	0,038	0,412
Insul. vs S. dif.	0,023	0,144	0,061	0,002
Octreoscan	0,081	0,006	0,359	0,004
Tessuto (pancreas vs intestino)	0,97	0,42	0,042	0,35
Stato a 12 mesi	0,035	0,046	0,993	0,039
DF vs SD	0,505	0,333	0,986	0,874
DF vs PD	0,031	0,063	0,909	0,016
SD vs PD	0,012	0,015	0,924	0,026
Ki-67	0,084	0,068	0,715	0,001

Tabella 12: Nella tabella sono indicati i valori di significatività che risultano dal confronto dei diversi gruppi. In grassetto sono indicati i valori significativi (P<0.05).

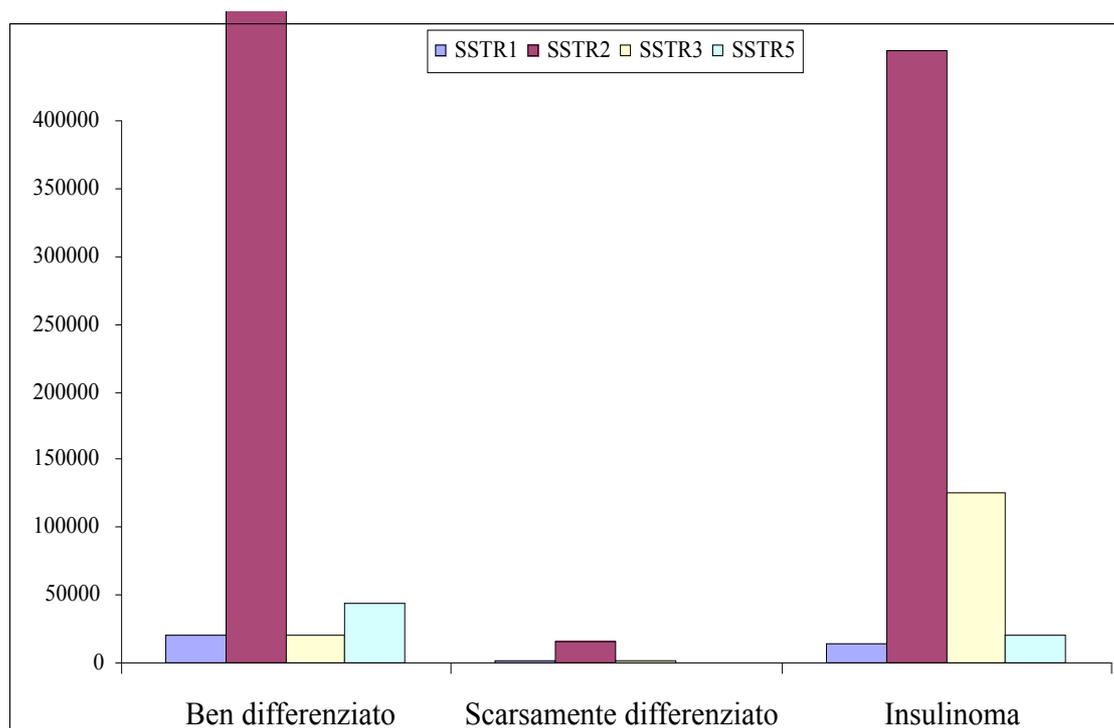


Figura 20: Il grafico mostra la media dei trascritti di SSTR1, 2, 3 e 5 dei tre gruppi istologici di tumori gastro-entero-pancreatici.

DISCUSSIONE

Il trattamento proposto per gli adenomi ipofisari e per i tumori neuroendocrini in generale è molto frequentemente l'asportazione chirurgica, ma sia per l'alto numero di recidive, sia per la talora impossibilità della completa rimozione chirurgica, molto spesso al trattamento chirurgico viene affiancato il trattamento con gli analoghi della somatostatina.

Oggigiorno lo sviluppo di nuovi e più potenti analoghi suggerisce la possibilità di controllare la crescita tumorale di neoplasie che esprimono i recettori della SST con i farmaci di nuova generazione.

L'effetto terapeutico degli analoghi della SST nel trattamento dei tumori acromegalici storicamente risiede nella loro azione di inibizione della secrezione ormonale. Inoltre stanno aumentando le evidenze sperimentali di un ruolo antiproliferativo degli analoghi della SST in alcuni adenomi ipofisari ³⁷. Comunque l'uso di octreotide e lanreotide in vivo come farmaci ad azione antiproliferativa non ha avuto il successo che ci si aspettava. In particolare il trattamento di pazienti acromegalici con octreotide e lanreotide ha avuto come risultato solo una moderata riduzione della grandezza del tumore ⁵⁹. Anche gli adenomi ipofisari non funzionanti, che si manifestano per l'effetto massa sulle strutture circostanti, di solito non rispondono al trattamento corrente con gli analoghi della SST. E' quindi evidente che sono necessari in vivo nuovi farmaci con azione antiproliferativa più potente.

Il fatto che molti tumori esprimono più di un SSTR ⁶⁰ ha portato a progettare analoghi con elevata affinità per più di un recettore. Uno di questi farmaci è l'analogo bispecifico BIM-23244 che ha elevata affinità per SSTR 2 e 5 e che è già stato visto abbassare la secrezione di GH e PRL ^{61 62}. Recentemente è stato disegnato l'analogo SOM230, che ha preso come modello la somatostatina nativa SMS-14, che si lega con alta affinità a SSTR1, 2, 3 e 5 ¹.

Lo studio effettuato sugli adenomi ipofisari riporta i livelli di mRNA di SSTR1, 2, 3 e 5 in 4 ACRO, 3 CUSH e 9 NFPA.

SSTR1 è il recettore con il più basso livello di mRNA, seguito da SSTR5, mentre SSTR2 e 3 presentano il più alto livello di espressione. In particolare SSTR1 è espresso a livelli bassi nei CUSH, in molti NFPA e in un ACRO.

Gran parte degli adenomi ipofisari esprimono SSTR2 e non c'è una significativa differenza di espressione tra i diversi tipi di tumore. Sorprendentemente l'espressione di SSTR3 è alta in quasi tutti i tumori esaminati ed in particolare è più alto negli NFPA. SSTR5, infine, è espresso in elevate quantità nei tumori GH- e ACTH-secernenti, mentre non è espresso, se non in minima parte, negli adenomi non funzionanti.

I livelli di espressione dei recettori della SST negli adenomi ipofisari non funzionanti sono gli stessi trovati in una recentissima pubblicazione dal gruppo di Taboada ⁶³ ed in particolare anche loro descrivono una predominanza dell'mRNA di SSTR3 negli NFPA esaminati. Se il ligando che attiva SSTR3 media l'apoptosi cellulare, come descritto la prima volta da Sharma et al. 44, si può predire, con i risultati ottenuti in questo studio, che gran parte degli adenomi ipofisari non funzionanti (quelli che esprimono livelli funzionali di SSTR3) possano regredire in risposta al selettivo agonista per SSTR3 o al ligando universale SOM230.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti del nuovo analogo SOM230 sulla secrezione ormonale e sulla vitalità cellulare in colture cellulari primarie e di metterli a confronto con gli effetti dell'octreotide. L'enfasi di questo lavoro è stata data all'abilità del nuovo composto di diminuire la proliferazione cellulare alla concentrazione di 1 μ M. La scelta di utilizzare inizialmente questo valore è dovuta al fatto che in due recenti pubblicazioni sugli effetti dell'octreotide in cellule tumorali pituitarie in coltura, la concentrazione utilizzata era di 1 μ M ⁶⁴ ⁶⁵. Infatti lo studio di dose risposta effettuato in 3 ACRO e 3 NFPA ha mostrato che, mentre il SOM230 ha funzionato a dosi più basse,

octreotide era effettivo solo alla concentrazione di 1µM. Poichè il nostro scopo era quello di confrontare l'azione di SOM230 con quella di octreotide, abbiamo deciso di trattare le colture di cellule tumorali inizialmente con la concentrazione di 1µM di ciascun analogo e di usare concentrazioni più basse solo se il numero di cellule fosse stato sufficiente.

Quando abbiamo messo a confronto il SOM230 e l'octreotide per la loro abilità di ridurre la secrezione ormonale, abbiamo trovato che l'effetto di SOM230 era più potente, infatti esso abbassava la concentrazione di GH in tutti e 6 gli ACRO presi in considerazione, mentre l'octreotide solo in 2 su 6 casi. Il trascritto SSTR2 è stato trovato in tutti gli acromegalici e SSTR5 in gran parte degli ACRO. La presenza dell'mRNA di SSTR2 e 5 giustifica la maggior efficacia di SOM230 rispetto all'octreotide nell'abbassare la secrezione di GH. D'altra parte la determinazione della presenza di SSTR potrebbe non spiegare la resistenza di alcuni casi ad octreotide, che è in contrasto con recenti pubblicazioni che riportano invece bassi livelli di trascritto di SSTR2 in tumori resistenti al trattamento con octreotide⁶⁶. Importante è rilevare il fatto che SOM230 ha avuto effetto antisecretorio su tumori che non rispondevano al trattamento con octreotide in vitro. Questo fatto è di particolare rilevanza in quanto octreotide e lanreotide costituiscono i farmaci di prima scelta per curare l'acromegalia, e una percentuale dei pazienti trattati non rispondono o rispondono solo parzialmente al trattamento standard con questi analoghi. Il potente effetto antisecretorio di SOM230, come rivelato nel presente studio e come documentato estesamente in lavori precedenti, potrebbe far sì da proporre questo nuovo analogo come candidato alternativo per il trattamento dell'acromegalia⁶⁷.

L'effetto di entrambi gli analoghi sulla vitalità cellulare è stato esaminato su tutti gli ACRO presi in considerazione in questo studio. L'octreotide ha diminuito la vitalità cellulare in 5 casi, mentre il SOM230 è stato effettivo in 9 casi su 12. Non è stata rivelata alcuna correlazione tra l'espressione dei recettori della SST e l'effetto antiproliferativo di entrambi gli analoghi. Questi dati sono

in accordo con precedenti lavori che non avevano trovato correlazione tra l'azione antiproliferativa di SMS-14 e lanreotide con l'espressione di SSTR2 e 564.

Una parte di questo lavoro è stata dedicata all'effetto di SOM230 sui CUSH, comparato a quello di octreotide. Dei 4 CUSH trattati con i due analoghi, entrambi hanno diminuito la secrezione di ACTH in un caso, mentre un altro ha risposto a SOM230 ma non ad octreotide. Octreotide e SOM230 diminuiscono la vitalità cellulare in un caso, mentre negli altri due non hanno mostrato alcun effetto. Anche octreotide è stato precedentemente riportato diminuire la secrezione di ACTH nei CUSH in vitro, mentre lo stesso effetto non è stato trovato nei pazienti con la sindrome di Cushing in vivo^{68 69}. Nonostante il numero dei casi di CUSH usati nel presente studio è troppo piccolo per ricavare delle conclusioni definitive, si può comunque affermare che il SOM230 è stato effettivo per la sua azione antiproliferativa ed il suo effetto antisecretorio nei pochi casi studiati. In un recente studio è stata trovata un'associazione tra l'espressione di SSTR5 e l'inibizione preferenziale di SOM230 rispetto octreotide del rilascio di ACTH in adenomi corticotropi umani in vitro, che suggerisce il potenziale effetto di SOM230 nel trattamento di pazienti con la sindrome di Cushing⁷⁰. Rimane da dimostrare se il SOM230, al contrario dell'octreotide, è capace di sostenere l'effetto antisecretorio ed antiproliferativo in vivo.

Gli NFPA costituiscono il 40% di tutti i tumori ipofisari e causano disagio per il loro l'effetto massa sulle strutture circostanti. La maggior parte di questi tumori non risponde completamente alla chirurgia o al trattamento standard con gli analoghi della somatostatina, per cui i più potenti analoghi potrebbero rappresentare dei candidati per la loro terapia⁷¹.

La somministrazione di SOM230 diminuisce significativamente la vitalità cellulare di 9 su 18 NFPA, mentre octreotide è stato effettivo in 4 casi, due dei quali hanno risposto solo ad octreotide. La mancanza di risposta ad octreotide

nella maggior parte degli NFPA non è sorprendente in quanto pochi sono gli studi che dimostrano un'azione antiproliferativa di octreotide in colture cellulari primarie di NFPA 65. Una spiegazione della resistenza ad octreotide potrebbe essere l'assenza dell'espressione di SSTR con affinità per octreotide, per esempio SSTR2. Comunque è stata dimostrata la multipla espressione di SSTRs negli NFPA ^{72 73 74}. Per quantificare l'espressione dei recettori SSTR1, 2, 3 e 5 è stata allestita una PCR Real Time quantitativa. Molti NFPA hanno mostrato livelli di mRNA di SSTR2 comparabili a quelli degli ACRO e livelli molto alti di SSTR3, che è il recettore che media gli effetti anti apoptotici della SST 42. Comunque non abbiamo trovato alcuna correlazione tra la risposta ad octreotide o al SOM230 e i livelli di SSTR. La ragione della resistenza al trattamento con gli analoghi, nonostante la presenza dei recettori, non è ancora chiara. E' possibile che siano responsabili una difettiva desensitizzazione recettoriale o che ci sia un difetto nel signaling intracellulare ⁷⁵. Il gruppo di Ballarè ha ipotizzato che alcune mutazioni siano in grado di bloccare l'azione antiproliferativa della SST e di attivare il pathway mitogenico in pazienti resistenti all'analogo octreotide ed in particolare ha trovato la sostituzione da Arg a Trp nel codon 240 del gene SSTR5 in un paziente acromegalico resistente ad octreotide 2.

Dai risultati ottenuti nel nostro studio si può comunque affermare che il SOM230 è stato più efficace di octreotide, in quanto ha diminuito la vitalità cellulare nella metà degli NFPA analizzati. Questi risultati potrebbero quindi suggerire il SOM230 come potenziale analogo della somatostatina per il trattamento farmacologico degli adenomi ipofisari non funzionanti.

In conclusione la prima parte di questo studio riporta gli effetti del nuovo analogo universale SOM230 sulla secrezione ormonale e sulla vitalità cellulare in colture cellulari primarie di adenomi ipofisari. Questo è uno dei primi lavori che dimostra l'efficacia del SOM230 nel diminuire la vitalità cellulare di cellule tumorali in coltura. Il presente studio focalizza l'attenzione sul confronto fra il SOM230 e l'octreotide. Studi più approfonditi sono necessari per esaminare

l'azione di questo nuovo analogo e determinare la sua potenziale azione nel trattamento dei differenti tipi di adenomi ipofisari. La somatostatina è un potente inibitore della crescita cellulare ma i tentativi di usarlo come farmaco per limitare la crescita cellulare tumorale non sono ancora stati bene considerati. Oggigiorno lo sviluppo di nuovi e più potenti analoghi della SST suggerisce la possibilità di controllare la crescita di tumori esprimenti gli SSTR con i farmaci di nuova generazione.

Avendo a nostra disposizione alcuni frammenti di biopsie tumorali appartenenti a pazienti che non rispondevano al trattamento con gli analoghi della SST in vitro, abbiamo deciso di effettuare su queste uno studio preliminare di analisi molecolare del DNA genomico per verificare l'ipotesi di una associazione tra i diversi polimorfismi e la resistenza ai farmaci.

Negli ultimi anni si sono infatti sviluppati alcuni studi investiganti la possibile associazione di polimorfismi e la suscettibilità alla patologia e/o la resistenza ai farmaci. Studi recenti riportano l'associazione dei polimorfismi del gene SSTR5 e disturbi bipolari nella popolazione danese e britannica. Essi hanno ipotizzato che il ridotto tono somatostatinergico o l'alterata interazione di SSTR5 con il recettore della dopamina D2 potrebbero essere responsabili della patogenesi di questo disordine ⁷⁶. In un recente studio effettuato su pazienti con acromegalia attiva è stato trovato un possibile ruolo delle varianti polimorfiche Pro335Leu e t-461c del gene SSTR5 con i livelli degli ormoni GH e IGF-1 mentre le varianti trovate in SSTR2 e SSTR5 sembrano avere un ruolo minore nel determinare la diversa responsività agli analoghi della somatostatina ⁷⁷.

Nel nostro studio, effettuato su 5 biopsie di adenomi ipofisari non funzionanti, l'analisi D-HPLC con successivo sequenziamento ha permesso di individuare nel gene SSTR2 un TG-dinucleotide tandem repeat nell'esone 1 e nella regione 3'UTR la mutazione g. 5542 A>G nei campioni N2 e N4 rispettivamente, che esprimono a livello medio il recettore 2 ma non rispondono ai farmaci. Nel gene

SSTR5 sono state trovate due mutazioni missenso già descritte in letteratura e una mutazione silente non descritta. Più precisamente nel campione N7, che esprime SSTR2 e SSTR5 ma che non risponde al trattamento con octreotide, abbiamo trovato la mutazione germinale missenso Leu48Met. Sia leucina che metionina sono amminoacidi idrofobici che si trovano nel dominio transmembrana del recettore. Questa sostituzione potrebbe interferire con la struttura dell' α elica del recettore ⁷⁸. Nei campioni N2 e N4, che non esprimono SSTR5 e non rispondono al trattamento coi farmaci, è stata trovata la mutazione missenso Pro335Leu, la stessa descritta dal gruppo di Filopanti menzionata precedentemente, che si trova nella porzione intracellulare C-terminale del recettore, regione contenente il segnale molecolare di internalizzazione ⁷⁹.

In conclusione le mutazioni trovate a carico dei geni SSTR2 e SSTR5 potrebbero portare ad una riduzione dell'affinità di legame con gli analoghi della somatostatina e cambiare lo stato del tumore e forse il suo sviluppo, ma ulteriori studi in una popolazione più grande sono necessari per confermare questi dati preliminari e comunque le mutazioni trovate andrebbero sottoposte ad un più approfondito esame di mutagenesi funzionale.

La mutazione più interessante trovata è una perdita di eterozigoti nel locus del gene SSTR5 con la ritenzione delle varianti 52Val e 335L nel campione N3, che esprime in elevate quantità SSTR2, e livelli molto bassi SSTR5, e non risponde ai farmaci.

Premesso che gli adenomi ipofisari non funzionanti sono invasivi e difficili da rimuovere chirurgicamente e che sono stati ipotizzati, tra gli eventi iniziali della tumorigenesi, processi di perdita di geni oncosoppressori (TGS= tumor suppressor gene), è possibile che l'accumularsi della perdita di TGS portino ad una maggiore aggressività ed invasività di questi tumori ⁸⁰.

Recentemente sono stati effettuati studi analoghi su adenomi tireotropi ed in particolare è stata trovata una perdita di eterozigosi nel locus del gene SSTR5 con la ritenzione della variante 335L, esattamente come nel nostro studio, che

sembra essere associato ad una insolita aggressività del tumore e una resistenza alla terapia con analoghi della SST ⁸¹.

La mutazione Ala52Val (trovata nel campione di sangue del paziente N3), come Leu48Met, determina piccoli cambiamenti dal punto di vista chimico, della proteina 78. Infatti Ala e Val sono piccoli amminoacidi idrofobici e Leu e Met sono grandi amminoacidi idrofobici. Non è comunque da escludere che il piccolo cambiamento chimico della proteina possa alterare l'affinità di legame o la stabilità del recettore. In particolare la sostituzione di Ala con Val, nella regione transmembrana del recettore, sembra interferire con la struttura dell'alfa elica 78.

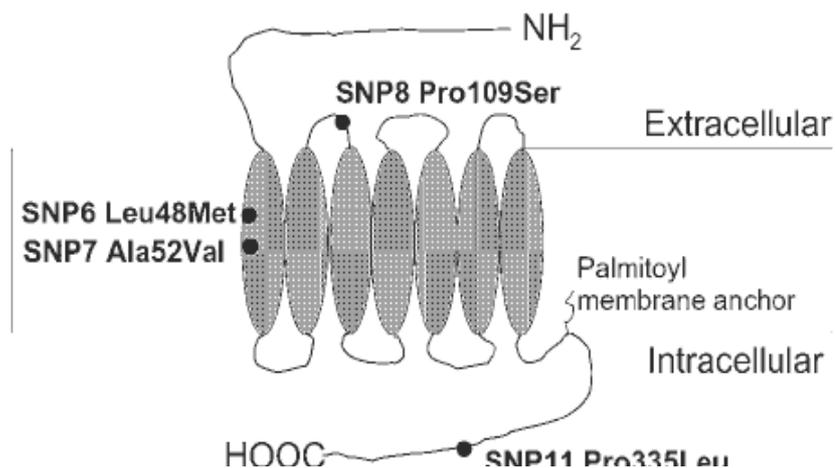


Figura 21: Rappresentazione schematica di SSTR5, che ne illustra la topologia, con i domini transmembrana, intracellulare ed extracellulare. I punti neri rappresentano le mutazioni missenso trovate in un gruppo di pazienti con disturbi bipolari 78.

In conclusione la perdita di eterozigosi nel locus del gene SSTR5 è un fenomeno raro, che si presenta nel 10% dei tumori ipofisari, e sembra essere associato ad un fenotipo aggressivo, almeno negli adenomi tireotropi ⁸¹ e probabilmente anche negli adenomi non funzionanti. Sono comunque necessari ulteriori studi per confermare questa associazione e per identificare altri geni, oltre SSTR5, persi in questi tumori.

In ultimo è stata valutata l'espressione dei recettori della somatostatina in un gruppo di 20 pazienti con tumori endocrini del tratto gastro-entero-pancreatico. Come per gli adenomi ipofisari l'espressione dei vari sottotipi recettoriali rappresenta un utile strumento per predire l'efficacia del trattamento farmacologico con gli analoghi della SST ed in particolare diventa molto importante stabilire il pattern di espressione dei recettori per selezionare l'analogo della somatostatina più appropriato, avendo a nostra disposizione oggi farmaci con affinità selettive per i diversi recettori.

Il trattamento farmacologico con octreotide o lanreotide di tumori neuroendocrini inoperabili o metastatici si è visto che riduce la ipersecrezione ormonale e talvolta riesce anche a ridurre la grandezza del tumore ⁸². In particolare in pazienti con carcinoidi metastatici il trattamento farmacologico convenzionale ha dato buoni risultati nel 40-50% dei casi, determinando temporanea stabilizzazione della malattia in più dell'80% dei pazienti e regressione tumorale nel 10% circa dei casi ^{83 84}.

Lo studio effettuato sui tumori gastro-entero-pancreatici riporta l'espressione di SSTR1, 2, 3 e 5 in 10 tumori pancreatici e in 10 tumori gastro-intestinali. In linea generale abbiamo trovato che i tumori scarsamente differenziati non esprimono i recettori della SST (SSTR1-5), mentre tutti gli altri tumori presentano un livello medio alto di SSTR2 e 5, ed esprimono a livelli bassi SSTR1. SSTR3 è molto espresso negli insulinomi e non è espresso nei gastrinomi, mentre è interessante osservare che SSTR3 è più espresso nei tumori pancreatici rispetto ai gastro-intestinali, come descritto in un recente lavoro da O'Toole et al. ⁸⁵. Sembra che SSTR3 sia il sottotipo recettoriale predominante nelle cellule endoteliali ⁸⁶ e probabilmente SSTR3 è presente anche nei capillari che circondano i nostri tumori pancreatici. Recentemente si è visto che la somatostatina inibisce l'angiogenesi tumorale agendo su SSTR3 nel sarcoma di Kaposi che coesprime fattori angiogenici e SSTR3, mentre il trattamento con

l'antagonista di SSTR3 (BN81658) reverte in modo significativo l'effetto della somatostatina ⁸⁷.

Nel nostro studio abbiamo messo a confronto il pattern di espressione dei recettori della somatostatina con i parametri clinici dei pazienti presi in esame.

Abbiamo trovato una correlazione significativa ($P < 0,001$) tra bassi livelli di espressione di SSTR5 e Ki-67 (marker di proliferazione cellulare) alto, e quindi sembra che SSTR5 sia correlato con il comportamento aggressivo del tumore, stesso risultato descritto nel recente studio effettuato su tumori gastro-entero-pancreatici dal gruppo di O'Toole ⁸⁵.

Confrontando il quadro istologico con l'espressione dei recettori, abbiamo trovato che i tumori ben differenziati presentano una maggiore quantità di trascritto rispetto agli scarsamente differenziati ed in particolare c'è una differenza significativa tra tumori ben differenziati e quelli scarsamente differenziati per l'espressione di SSTR1, 2 e 5, mentre per l'SSTR3 c'è differenza significativa tra i tumori ben differenziati e gli insulinomi (B. dif vs Insul.).

Per quel che riguarda la correlazione con il decorso della malattia c'è una differenza significativa tra l'espressione dei sottotipi recettoriali 1, 2 e 5 dei pazienti liberi da malattia e quella dei pazienti con malattia in progressione e tra i pazienti con malattia stabile e quelli con malattia in progressione.

Che i tumori ben differenziati abbiano più recettori degli scarsamente differenziati e che i pazienti con malattia stabile o liberi da malattia abbiano più recettori dei pazienti con malattia in progressione, sono evidenze abbastanza intuitive da supporre, ma rappresentano comunque dati importanti in quanto vengono descritti per la prima volta in questo studio.

In ultimo abbiamo trovato una correlazione significativa tra l'espressione di SSTR2 e 5 e la positività di Octreoscan, dato che rappresenta un'importante conferma dell'affidabilità del metodo di quantificazione dei recettori della SST. Inoltre, come già accennato, questo esame scintigrafico è molto utile per

localizzare il tumore endocrino e verificare la presenza dei recettori della SST ma non è purtroppo in grado di quantificare le proteine recettoriale.

La quantificazione dei trascritti messa a punto nel nostro laboratorio rappresenta invece uno strumento molto utile e affidabile per predire l'efficacia del trattamento farmacologico con gli analoghi della SST e, considerata la sua rilevanza, potrebbe anche essere inclusa nelle analisi patologiche di routine effettuate per i tumori neuroendocrini.

Ulteriori studi in una popolazione più grande sono comunque necessari per confermare questi dati preliminari ed inoltre sarebbe molto interessante estendere l'analisi molecolare del DNA genomico ai tumori endocrini del tratto gastro-entero-pancreatico, per poter individuare anche in questo gruppo di neoplasie le mutazioni responsabili della resistenza ai farmaci.

PUBBLICAZIONI

Corleto VD, Severi C, Romano G, Tattoli I, Weber HC, Stridsberg M, Rindi G, Campanini N, Tomassoni F, Pagotto U, Coy DH, Jensen RT, Delle Fave G. Somatostatin receptor subtypes mediate contractility on human colonic smooth muscle cells. *Neurogastroenterol Motil.* 2006 Mar;18(3):217-25.

<http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2982.2005.00752.x>

BIBLIOGRAFIA

¹ Bruns C, Briner U, Lewis G, Meno-Tetang G & Weckbecker G. SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with broad SRIF receptor binding and a unique inhibitory profile. *European Journal of Endocrinology* 2002 146 707–716.

² Ballare` E, Persani L, Lania AG, Filopanti M, Giammona E, Corbetta S, Mantovani S, Arosio M, Beck-Peccoz P, Faglia G, Spada A 2001 Mutation of somatostatin receptor type 5 in an acromegalic patient resistant to somatostatin analog treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3809–3814.

³ Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003; 97(4):934-959.

⁴ Rindi G, Luinetti O, Cornaggia M, Capella C, Solcia E. Three subtypes of gastric argyrophil carcinoid and the gastric neuroendocrine carcinoma: a clinicopathologic study. *Gastroenterology* 1993; 104(4):994-1006.

⁵ Rindi G, Bordi C, Rappel S, La Rosa S, Stolte M, Solcia E. Gastric carcinoids and neuroendocrine carcinomas: pathogenesis, pathology, and behavior. *World J Surg* 1996; 20(2):168-172.

⁶ Lehy T, Cadiot G, Mignon M, Ruszniewski P, Bonfils S. Influence of multiple endocrine neoplasia type 1 on gastric endocrine cells in patients with the Zollinger-Ellison syndrome. *Gut* 1992; 33(9):1275-1279.

⁷ Jensen RT. Management of the Zollinger-Ellison syndrome in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Intern Med* 1998; 243(6):477-488.

⁸ Brandi ML, Aurbach GD, Fitzpatrick LA et al. Parathyroid mitogenic activity in plasma from patients with familial multiple endocrine neoplasia type 1. *N Engl J Med* 1986; 314(20):1287-1293.

⁹ Solcia E, Rindi G, Larosa S, Capella C. Morphological, molecular, and prognostic aspects of gastric endocrine tumors. *Microsc Res Tech* 2000; 48(6):339-348.

¹⁰ Bordi C, Falchetti A, Azzoni C et al. Aggressive forms of gastric neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type I. *Am J Surg Pathol* 1997; 21(9):1075-1082.

¹¹ Zyromski NJ, Kendrick ML, Nagorney DM et al. Duodenal carcinoid tumors: how aggressive should we be? *J Gastrointest Surg* 2001; 5(6):588-593.

¹² Hemminki K, Li X. Incidence trends and risk factors of carcinoid tumors: a nationwide epidemiologic study from Sweden. *Cancer* 2001; 92(8):2204-2210.

¹³ Bordi C. Aspetti anatomopatologici dei tumori endocrini gastroenteropancreatici. In: Rosato L, editor. *I tumori neuroendocrini*. CLUB delle U.E.C., 2003: 48-54.

¹⁴ Vinik AI, Thompson N, Eckhauser F, Moattari AR. Clinical features of carcinoid syndrome and the use of somatostatin analogue in its management. *Acta Oncol* 1989; 28(3):389-402.

¹⁵ Wilder R, Allan R, Power M, Robertsson H. Carcinoma of the island of the pancreas, hiperinsulinemia and hypoglycemia. *JAMA* 1927; 89:348-355.

¹⁶ Zollinger RM, Ellison EH. Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas. 1955. *CA Cancer J Clin* 1989; 39(4):231-247.

¹⁷ Norton JA, Jensen RT. Current surgical management of Zollinger-Ellison syndrome (ZES) in patients without multiple endocrine neoplasia-type 1 (MEN1). *Surg Oncol* 2003; 12(2):145-151.

¹⁸ Norton JA, Alexander HR, Fraker DL, Venzon DJ, Gibril F, Jensen RT. Possible primary lymph node gastrinoma: occurrence, natural history, and predictive factors: a prospective study. *Ann Surg* 2003; 237(5):650-657.

¹⁹ Mignon M., Jais P., Cadiot G., Ben Yadder D., Vatie J. Clinical features and advances in biological diagnostic criteria for Zollinger-Ellison Syndrome. In: Mignon M., Jensen R.T., editors. *Endocrine tumors of the pancreas: recent advances in research and management*. 1995: 223-239.

²⁰ Verner JV, Morrison AB. Islet cell tumor and a syndrome of refractory watery diarrhea and hypokalemia. *Am J Med* 1958; 25(3):374-380.

²¹ Vinik AI, Strodel WE, Eckhauser FE, Moattari AR, Lloyd R. Somatostatinomas, PPomas, neurotensinomas. *Semin Oncol* 1987; 14(3):263-281.

²² Patel YC, Ganda OP, Benoit R. Pancreatic somatostatinoma: abundance of somatostatin-28(1-12)-like immunoreactivity in tumor and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57(5):1048-1053.

²³ Benson L, Ljunghall S, Akerstrom G, Oberg K. Hyperparathyroidism presenting as the first lesion in multiple endocrine neoplasia type 1. *Am J Med* 1987; 82(4):731-737.

²⁴ Kloppel G, Willemer S, Stamm B, Hacki WH, Heitz PU. Pancreatic lesions and hormonal profile of pancreatic tumors in multiple endocrine neoplasia type I. An immunocytochemical study of nine patients. *Cancer* 1986; 57(9):1824-1832.

²⁵ M. O. Thorner, M. Lee Vance, E. R. Laws et al. The anterior pituitary; In *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th edition, J. Wilson et al. eds.; WB Saunders CO, Philadelphia 1998; 249-340.

²⁶ Shimon I., Melmed S. Genetic basis of endocrine disease: pituitary tumor pathogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82, 1675-1681.

²⁷ Herman V., Fagin J., Gonsky K., et al. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71, 1427-1433

-
- ²⁸ Heaney AP. *British Medical Bulletin* 2006; 75 e 76: 81–97.
- ²⁹ Horvath E, Kovacs K, Scheithauer BW. Pituitary hyperplasia. *Pituitary* 1999;1:169–80.
- ³⁰ Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J. and Guillemin R. (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179, 77–79.
- ³¹ Pradayrol L., Jornvall H., Mutt V. and Ribet A. (1980) N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.* 109, 55–58.
- ³² Reichlin S. (1983a) Somatostatin (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 309, 1556–1563.
- ³³ Reichlin S. (1983b) Somatostatin. *N. Engl. J. Med.* 309, 1495–1501.
- ³⁴ Aguila M. C. (1994) Growth hormone-releasing factor increases somatostatin release and mRNA levels in the rat periventricular nucleus via nitric oxide by activation of guanylate cyclase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 782–786.
- ³⁵ Epelbaum J., Dournaud P., Fodor M. and Viollet C. (1994) The neurobiology of somatostatin. *Crit. Rev. Neurobiol.* 8, 25–44.
- ³⁶ Elliott D. E., Blum A. M., Li J., Metwali A. and Weinstock J. V. (1998) Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines. *J. Immunol.* 160, 3997–4003.
- ³⁷ Patel Y. C. (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front. Neuroendocrinol.* 20, 157–198.

-
- ³⁸ Lamberts S.W.J., Krenning E.P., Klijn J.C.M. and Reubi J.C. (1990) Clinical application of somatostatin analogs. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1, 139–144.
- ³⁹ Lahlou M, Guillermet J, Hortala M, et al. Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014:121Y131.
- ⁴⁰ Schally AV. Oncological applications of somatostatin analogues. *Cancer Res.* 1988;48:6977Y6985.
- ⁴¹ Cordelier P, Esteve JP, Bousquet C, et al. Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:9343Y9348.
- ⁴² Sharma K, Patel YC, Srikant CB. Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol.* 1996;10:1688Y1696.
- ⁴³ Lamberts SWJ, Hofland LJ. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:451Y457.
- ⁴⁴ Sharma K, Patel YC, Srikant CB. C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. *Mol Endocrinol.* 1999;13:82Y90.
- ⁴⁵ Lahlou M, Guillermet J, Hortala M, et al. Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014:121Y131.
- ⁴⁶ Pages P, Benali N, Saint-Laurent N, et al. Sst2 somatostatin receptor mediates cell cycle arrest and induction of p27Kip1. *J Biol Chem.* 1999;274:15186Y15193.
- ⁴⁷ Buscail L, Esteve J-P, Saint-Laurent N, et al. Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92: 1580Y1584.

⁴⁸ Buscail L, Delesque N, Esteve J, et al. Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91: 2315Y2319.

⁴⁹ Komatsuzaki K, Murayama Y, Giambarella U, et al. A novel system that reports the G-proteins linked to a given receptor: a study of type 3 somatostatin receptor. *FEBS Lett.* 1997;406: 165Y170.

⁵⁰ Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW & Hofland LJ. Octreotide. *New England Journal of Medicine* 1996 334 246–254.

⁵¹ Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC & Patel YC. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *Journal of Biological Chemistry* 2000 275 7862–7869.

⁵² Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC & Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of heterooligomers with enhanced functional activity [see comments]. *Science* 2000 288 154–157.

⁵³ Shimon I, Yan X, Taylor JE, Weiss MH, Culler MD & Melmed S. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. *Journal of Clinical Investigation* 1997 100 2386–2392.

⁵⁴ Ginj M, Chen J, Walter MA, Eltschinger V, Reubi JC, Maecke HR. Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11(3):1136-45.

⁵⁵ Huber C.G, Oefner P.J, et al. 1995 Rapid and accurate sizing of DNA fragments by ion-pair chromatography on alkylated nonporous poly(styrene-divinylbenzene). *Anal. Chem.* 67: 578-585.

⁵⁶ Hoogendoorn B, Owen M.J, et al. 1999 Genotyping single nucleotide polymorphism by primer extension and high performance liquid chromatography. *Hum. Genet.* 104: 89-93.

-
- ⁵⁷ O'Donovan M.C, Oefner P.J, et al. 1998 Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics*. 52: 44-49.
- ⁵⁸ Huber C.G, Oefner P.J, et al. 1993 High-resolution liquid chromatography of oligonucleotides on non-porous alkylated styrene-divinylbenzene copolymers. *Anal. Biochem*. 212: 351-358.
- ⁵⁹ Melmed S, Jackson I, Kleinberg D, Klibanski A 1998 Current treatment guidelines for acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2646-2652.
- ⁶⁰ Reubi JC 2003 Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 24:389-427.
- ⁶¹ Saveanu A, Gunz G, Dufour H, Caron P, Fina F, Ouafik L, Culler MD, Moreau JP, Enjalbert A, Jaquet P 2001 Bim-23244, a somatostatin receptor subtype 2- and 5-selective analog with enhanced efficacy in suppressing growth hormone (GH) from octreotide-resistant human GH-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 86:140-145.
- ⁶² Ren SG, Taylor J, Dong J, Yu R, Culler MD, Melmed S 2003 Functional association of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in inhibiting human growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4239-4245.
- ⁶³ Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimaraes RF, Marcondes JB, Chimelli LM, Fontes R, Mata PJ, Filho PN, Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2007 Jan;156(1):65-74.
- ⁶⁴ Danila DC, Haidar JN, Zhang X, Katznelson L, Culler MD, Klibanski A 2001 Somatostatin receptor-specific analogs: effects on cell proliferation and growth hormone secretion in human somatotroph tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2976-2981.
- ⁶⁵ Florio T, Thellung S, Arena S, Corsaro A, Spaziante R, Gussoni G, Acuto G, Giusti M, Giordano G, Schettini G 1999 Somatostatin and its analog

lanreotide inhibit the proliferation of dispersed human non-functioning pituitary adenoma cells in vitro. *Eur J Endocrinol* 141:396-408.

⁶⁶ Jaquet P, Saveanu A, Gunz G, Fina F, Zamora AJ, Grino M, Culler MD, Moreau JP, Enjalbert A, Ouafik LH 2000 Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 85:781-792.

⁶⁷ Weckbecker G, Briner U, Lewis I, Bruns C 2002 SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs. *Endocrinology* 143:4123-4130.

⁶⁸ Stalla GK, Brockmeier SJ, Renner U, Newton C, Buchfelder M, Stalla J, Muller OA 1994 Octreotide exerts different effects in vivo and in vitro in Cushing's disease. *Eur J Endocrinol* 130:125-131.

⁶⁹ Lamberts SW, Uitterlinden P, Klijn JM 1989 The effect of the long-acting somatostatin analogue SMS 201-995 on ACTH secretion in Nelson's syndrome and Cushing's disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 120:760-766.

⁷⁰ Leo J Hofland, Joost van der Hoek, Richard Feelders, Maarten O van Aken, Peter M van Koetsveld, Marlijn Waaijers, Diana Sprij-Mooij, Christian Bruns, Gisbert Weckbecker, Wouter Wde Herder, Albert Beckers and Steven W J Lamberts. The multi-ligand somatostatin analogue SOM230 inhibits ACTH secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5. *European Journal of Endocrinology* 2005 152 645–654.

⁷¹ de Bruin TW, Kwekkeboom DJ, Van't Verlaat JW, Reubi JC, Krenning EP, Lamberts SW, Crougns RJ 1992 Clinically nonfunctioning pituitary adenoma and octreotide response to long term high dose treatment, and studies in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1310-1317.

⁷² Greenman Y, Melmed S 1994 Heterogeneous expression of two somatostatin receptor subtypes in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 78:398-403.

⁷³ Greenman Y, Melmed S 1994 Expression of three somatostatin receptor subtypes in pituitary adenomas: evidence for preferential SSTR5 expression in the mammosomatotroph lineage. *J Clin Endocrinol Metab* 79:724-729.

⁷⁴ Nielsen S, Mellekjaer S, Rasmussen LM, Ledet T, Olsen N, Bojsen-Moller M, Astrup J, Weeke J, Jorgensen JO 2001 Expression of somatostatin receptors on human pituitary adenomas in vivo and ex vivo. *J Endocrinol Invest* 24:430-437.

⁷⁵ Hofland LJ, Lamberts SW 2003 The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev* 24:28-47.

⁷⁶ Nyegaard M, Borglum AD, Bruun TG, Collier DA, Russ C, Mors O, Ewald H, Kruse TA 2002 Novel polymorphisms in the somatostatin receptor 5 (SSTR5) gene associated with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 7:745-754.

⁷⁷ M. Filopanti, C. Ronchi, E. Ballare`, S. Bondioni, A. G. Lania, M. Losa, S. Gelmini, A. Peri, C. Orlando, P. Beck-Peccoz, A. Spada 2005 Analysis of somatostatin receptors 2 and 5 polymorphisms in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 4824-4828.

⁷⁸ M Nyegaard , AD Børglum, TG Bruun, DA Collier, C Russ, O Mors, H Ewald, TA Kruse 2002 Novel polymorphisms in the somatostatin receptor 5 (SSTR5) gene associated with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry*;7(7):745-54.

⁷⁹ Hukovic N, Panetta R, Kumar U, Rocheville M, Patel YC. 1998 The cytoplasmic tail of the human somatostatin receptor type 5 is crucial for interaction with adenylyl cyclase and in mediating desensitization and internalization. *J Biol Chem*. Aug 14;273(33):21416-22.

⁸⁰ Clayton RN, Pfeifer M, Atkinson AB, Belchetz P, Wass JA, Kyrodimou E, Vanderpump M, Simpson D, Bicknell J, Farrell WE. Different patterns of allelic loss (loss of heterozygosity) in recurrent human pituitary tumors provide evidence for multiclonal origins. *Clin Cancer Res*. 2000 Oct;6(10):3973-82.

⁸¹ Filopanti M, Ballare E, Lania AG, Bondioni S, Verga U, Locatelli M, Zavanone LM, Losa M, Gelmini S, Peri A, Orlando C, Beck-Peccoz P, Spada A. Loss of heterozygosity at the SS receptor type 5 locus in human GH- and TSH-secreting pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest.* 2004 Nov;27(10):937-42.

⁸² Janson ET, Oberg K. Long-term management of the carcinoid syndrome: treatment with octreotide alone and in combination with alpha-interferon. *Acta Oncol.* 1993;32:225-229.

⁸³ Ruszniewski P, Ducreux M, Chayvialle JA, et al. Treatment of the carcinoid syndrome with the longacting somatostatin analogue lanreotide: a prospective study in 39 patients. *Gut.* 1996;39:279-283.

⁸⁴ Wymenga AN, Eriksson B, Salmela PI, et al. Efficacy and safety of prolonged-release lanreotide in patients with gastrointestinal neuroendocrine tumors and hormone-related symptoms. *J Clin Oncol.* 1999;17:1111.

⁸⁵ O'Toole D, Saveanu A, Couvelard A, Gunz G, Enjalbert A, Jaquet P, Ruszniewski P, Barlier A. The analysis of quantitative expression of somatostatin and dopamine receptors in gastro-entero-pancreatic tumours opens new therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol.* 2006 Dec;155(6):849-57.

⁸⁶ Albin A, Florio T, Giunciuglio D, Masiello L, Carlone S, Corsaro A, Thellung S, Cai T, Noonan DM & Schettini G. Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *FASEB Journal* 1999 13 647–655.

⁸⁷ Florio T, Morini M, Villa V, Arena S, Corsaro A, Thellung S, Culler MD, Pfeffer U, Noonan DM, Schettini G & Albin A. Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology* 2003 144 1574–1584.