



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA (XXXIII CICLO)

Corso di EMATO-ONCOLOGIA E MEDICINA INTERNA CLINICO-TRASLAZIONALE

Curriculum: FISIOPATOLOGIA E CLINICA DELLE MALATTIE ENDOCRINO-
METABOLICHE (CODICE 6662)

Fisiopatologia dei recettori della somatostatina nei tumori ipofisari GH-secerenti

DOTTORANDA

JESSICA AMARU'

RESPONSABILE SCIENTIFICO

PROF. DIEGO FERONE

SUPERVISORI

DOTT.SSA MARICA ARVIGO

DOTT. FEDERICO GATTO

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	4
1.1. <i>Anatomia e funzioni dell'ipofisi</i>	4
1.2. <i>Somatostatina e recettori della somatostatina</i>	7
1.3. <i>Tumori ipofisari neuroendocrini e loro trattamento</i>	11
1.4. <i>Tumori ipofisari GH-secerenti</i>	17
2. SCOPO DELLO STUDIO	20
3. MATERIALI E METODI.....	21
3.1. <i>Composti</i>	21
3.2. <i>Pazienti e tumori</i>	21
3.3. <i>Immunoistochimica (IHC)</i>	24
3.4. <i>Colture cellulari</i>	25
3.4.1. <i>Colture primarie di tumori somatotropi</i>	25
3.4.2. <i>Linea cellulare GH4C1</i>	25
3.5. <i>Secrezione di GH in vitro</i>	25
3.6. <i>Proliferazione cellulare</i>	26
3.7. <i>Quantificazione dei livelli di cAMP</i>	27
3.8. <i>Misurazione intracellulare di [Ca²⁺]</i>	27
3.9. <i>Immunocitofluorescenza (IF)</i>	28

3.10. Estrazione di RNA e PCR quantitativa (qRT-PCR)	29
3.11. Western Blotting	29
3.12. Calcolo dell'indice di combinazione	30
3.13. Analisi statistica	30
4. RISULTATI.....	31
4.1. Espressione proteica dei SST nei campioni di tumore ipofisario.....	31
4.2. Effetto di OCT e PAS sulla secrezione di GH nelle cellule somatotrope umane.....	33
4.3. Espressione dei SST nelle cellule GH4C1	37
4.4. Effetto inibitorio degli SRL sulla proliferazione cellulare, sui livelli di cAMP e di Ca ²⁺ nelle cellule GH4C1	38
4.5. Effetto del BIM-23627 sull'inibizione della proliferazione cellulare e sulla produzione di cAMP indotta dagli SRL nelle cellule GH4C1	41
4.6. Internalizzazione di SST ₂ e SST ₅ indotta da OCT e PAS nelle cellule GH4C1	43
5. DISCUSSIONE.....	45
6. CONCLUSIONI	50
7. BIBLIOGRAFIA.....	51
8. RINGRAZIAMENTI	58

1. INTRODUZIONE

1.1. *Anatomia e funzioni dell'ipofisi*

L'ipofisi è un organo di piccole dimensioni localizzato in una piccola cavità ossea chiamata sella turcica, coperta dal diaframma sellare, un'estensione della dura madre. La ghiandola ipofisaria regola gli scambi di segnali fisiologici tra l'ipotalamo e gli organi periferici e l'omeostasi corporea durante lo sviluppo, la crescita, la riproduzione, il metabolismo e la risposta allo stress [1]. La ghiandola è collegata funzionalmente e anatomicamente all'ipotalamo dall'eminanza mediana tramite il peduncolo infundibolare che consente ai fattori secreti dall'ipotalamo di raggiungere l'ipofisi. Questo organo è composto da due lobi principali distinti: l'adenipofisi (o ipofisi anteriore) e la neuroipofisi (o ipofisi posteriore) [2].

La neuroipofisi è composta principalmente dai terminali assonici dei neuroni magnocellulari appartenenti ai nuclei ipotalamici sopraottico e paraventricolare e da cellule gliali specializzate, i pituiciti, che possono contribuire alla regolazione della produzione degli ormoni neuroipofisari ossitocina e vasopressina (ormone antidiuretico, ADH) [3].

L'adenipofisi è divisa in tre regioni anatomiche: la pars tuberalis (nota anche come pars infundibularis), un'estensione di alcuni strati di cellule che circondano la regione esterna del peduncolo ipofisario inferiore; la pars intermedia (nota anche come lobo intermedio), che si trova in una zona marginale tra l'ipofisi anteriore e posteriore, e che negli uomini è rudimentale e mal definita; la pars distalis, che è la parte più grande dell'adenipofisi ed è anche conosciuta come lobo anteriore comprendente l'80% della ghiandola.

L'adenipofisi è costituita da gruppi di cellule specializzate che agiscono come unità funzionali, ciascuna delle quali produce e rilascia un particolare tipo di ormone: le cellule corticotrope rilasciano l'ormone adrenocorticotropo (ACTH, corticotropina), le cellule tireotrope

l'ormone tiroidostimolante (TSH, tireotropina), le cellule somatotrope l'ormone della crescita (GH, somatotropina), le cellule mammotrope la prolattina (PRL, lattotropina), le cellule gonadotrope l'ormone follicolo stimolante e l'ormone luteinizzante (rispettivamente FSH e LH, gonadotropine). Una piccola popolazione di cellule, dette somatomammotrope, produce sia GH che PRL.

Dal punto di vista istologico, nell'adenoipofisi si distinguono diversi tipi di cellule: le cromofobe, con una colorazione tenue all'ematossilina-eosina, e le cromofile, con una colorazione molto intensa che evidenzia la presenza di granuli secretori a livello citoplasmatico. A loro volta, le cellule cromofile si dividono in acidofile, con colorazione rossa all'ematossilina-eosina (cellule somatotrope e mammotrope), e in basofile, con colorazione blu (cellule gonadotrope, corticotrope e tireotrope).

Queste cellule secernenti sono associate a cellule follicolo stellate, che non producono ormoni, hanno piccole dimensioni, una forma irregolare ramificata con processi citoplasmatici allungati e hanno la funzione di fornire una trama di supporto e un microambiente favorevole alle cellule che producono gli ormoni [2].

La secrezione ormonale dell'ipofisi è regolata principalmente attraverso l'immissione in circolo di fattori ipotalamici (*releasing e inhibiting hormones*) che raggiungono l'ipofisi grazie alla circolazione portale ipofisaria. Tale sistema è costituito da capillari fenestrati, che consentono il trasporto degli ormoni ipotalamici direttamente alle cellule adenoipofisarie specializzate. In questo modo, i fattori di rilascio ipotalamici stimolanti ed inibenti, insieme ai segnali di feedback provenienti dagli organi bersaglio (che includono gli ormoni circolanti in periferia e i neurotrasmettitori non ormonali), convergono con i fattori autocrini e paracrini, per indurre la regolazione della trascrizione, della traduzione e della secrezione degli ormoni ipofisari. Ognuno di questi ormoni induce risposte specifiche nei tessuti periferici. Complessivamente, questi meccanismi

regolatori gestiscono in modo accurato e dinamico i processi omeostatici della ghiandola [4] (Figura 1).

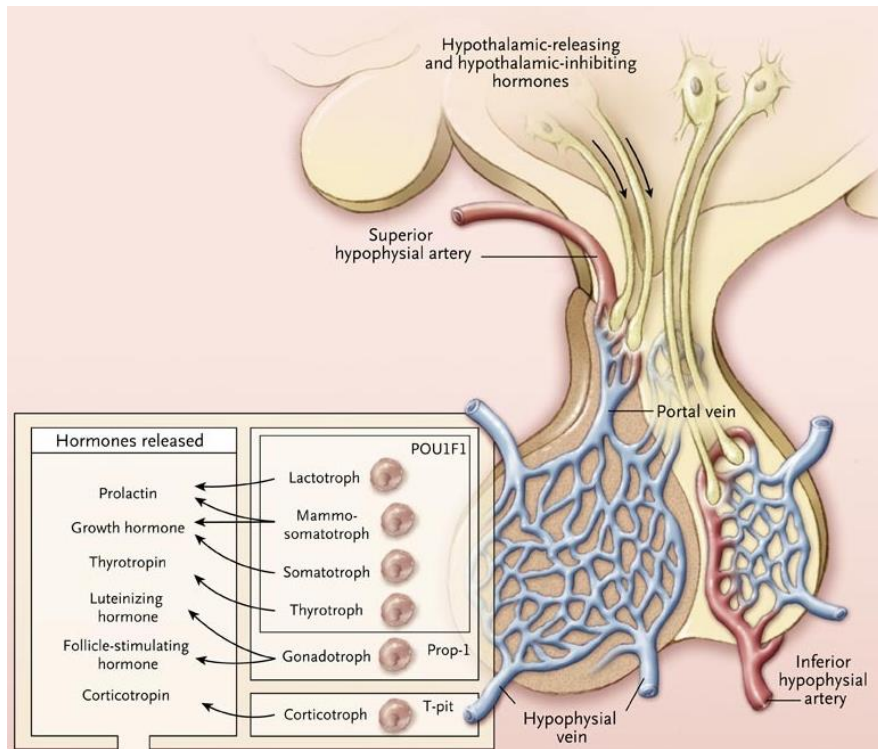


Figura 1. Rappresentazione semplificata dell'asse ipotalamo-ipofisario e dei differenti tipi cellulari che secernono ormoni a livello ipofisario [5].

1.2. Somatostatina e recettori della somatostatina

La somatostatina (*somatotrophin release-inhibiting factor*, SRIF) è un ormone polipeptidico prodotto in varie sedi dell'organismo, in particolare dall'ipotalamo dove inibisce la secrezione ipofisaria di GH (ma anche di TSH, ACTH e prolattina), dal pancreas dove inibisce il rilascio di insulina e glucagone, dal tratto gastro-intestinale dove inibisce la secrezione di acido cloridrico e gastrina nello stomaco e da cellule del sistema APUD [6].

Esistono due forme biologicamente attive di questo ormone, una di 14 amminoacidi e una di 28, derivate da processi proteolitici a partire dai precursori prepro-somatostatina e pro-somatostatina.

La SRIF esercita i suoi effetti biologici, attraverso il legame con cinque sottotipi recettoriali specifici definiti SST₁₋₅ [7-9]. Tali recettori vengono codificati da differenti geni localizzati sui cromosomi 4, 17, 22, 20 e 16. Esistono due varianti di splicing per SST₂ che differiscono nella lunghezza del terminale carbossilico: una variante lunga di 369 aminoacidi (SST_{2A}) e una corta di 346 aa (SST_{2B}) [7,8]. I tessuti umani esprimono quasi esclusivamente la variante SST_{2A}, mentre i roditori esprimono entrambe le forme [10]. Recentemente sono state identificate due isoforme tronche di SST₅ (SST₅TMD4 e SST₅TMD5) presenti sia nell'uomo che nel topo [11].

Tutti i SST appartengono alla famiglia dei recettori a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G (GPCRs) [12], che mediano la maggior parte delle risposte a segnali extracellulari. In generale, tutti i GPCR hanno una struttura simile, che consiste in una singola catena polipeptidica divisa in tre regioni: una regione extracellulare, che comprende la porzione N-terminale ed i loop extracellulari e forma la tasca di interazione con il ligando; una regione transmembrana, che attraversa sette volte il doppio strato lipidico e interagisce con le proteine G; una regione intracellulare con la porzione C-terminale, importante per la regolazione del segnale [13].

Tutti i GPCR interagiscono con il ligando sul versante extracellulare e questa interazione provoca un cambiamento conformazionale nella regione transmembrana ed intracellulare che si traduce nell'attivazione di specifiche vie di trasduzione del segnale intracellulare.

Le molecole implicate nella trasduzione del segnale sono le proteine G, composte da tre subunità proteiche (α , β e γ) che hanno attività differenti. Il tipo di segnale che viene attivato dipende dalla subunità α ; ne esistono infatti diverse tipologie raggruppate in 4 classi: $G_{\alpha s}$ attiva l'enzima adenilato ciclasi (AC), $G_{\alpha q}$ attiva la fosfolipasi C, $G_{\alpha i}$ e $G_{\alpha 0}$ inibiscono l'enzima AC.

L'associazione dei SST con le differenti proteine G è alla base della modulazione dell'attività di diversi enzimi chiave [14], come l'AC coinvolta nella secrezione ormonale e la fosfotirosin-fosfatasi (PTPasi) implicata nella regolazione del ciclo cellulare (Figura 2).

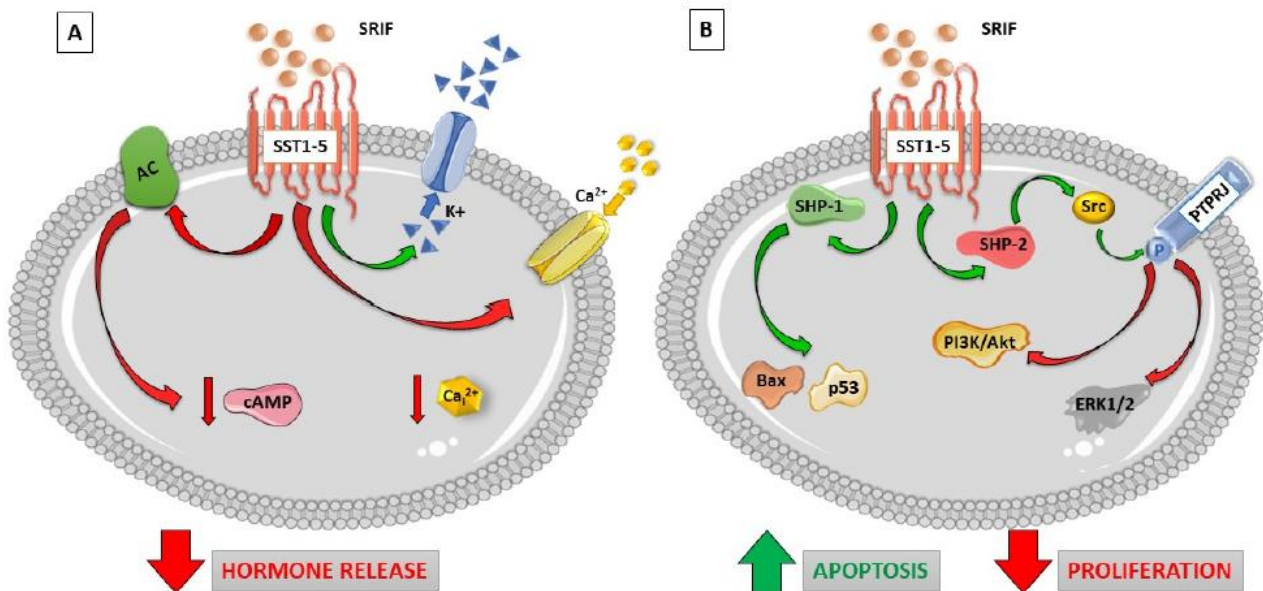


Figura 2. Rappresentazione schematica delle vie di trasduzione del segnale intracellulare innescate dal legame della SRIF ai suoi recettori [15]. Attività antisecretiva (A), antiproliferativa ed apoptotica (B) indotte dalla SRIF. [Freccie verdi: vie di trasduzione del segnale intracellulare attivate; freccie rosse: vie di trasduzione del segnale intracellulare inibite].

Per quanto riguarda l'AC, questo enzima viene regolato in modo negativo dal legame della SRIF con i suoi recettori di membrana, portando ad una diminuzione nella produzione dell'AMP ciclico (cAMP) con conseguente inibizione della secrezione ormonale, causata anche da un minor flusso di Ca^{2+} intracellulare e dall'iperpolarizzazione della membrana cellulare dovuta all'attivazione dei canali del K^+ [16,17].

Per quanto riguarda la famiglia delle PTPasi, in particolare sono coinvolti tre enzimi: le fosfatasi omologhe a Src di tipo 1 (SHP-1) e di tipo 2 (SHP-2), e la tirosin-fosfatasi PTPRJ (o PTP η) [18]. La SHP-1 sembra attivare in modo significativo i segnali pro-apoptotici intracellulari, attraverso l'attivazione delle caspasi, l'induzione di p53/Bax e l'inibizione degli effetti anti-apoptotici di JNK, mediata dall'attivazione di NF-kB. La SHP-2 attiva la tirosin-chinasi Src, la quale induce la fosforilazione di PTPRJ, che a sua volta defosforila PI3K/Akt e le protein-chinasi attivate da mitogeni (MAPK), come ERK1/2, alterando la proliferazione cellulare [19]. Queste cascate intracellulari inducono una up-regolazione degli inibitori della chinasi ciclina-dipendente (CDKI), come p27kip1 e p21cip1/waf1 [20-22], e del soppressore tumorale Zac1 [23] portando ad un aumento dell'effetto citostatico.

La PTPasi ha quindi un potenziale antiproliferativo che dipende anche dalla capacità di modificare il segnale indotto dai fattori di crescita (*growth factors*, GF) attraverso defosforilazioni selettive e inattivazioni di recettori per fattori di crescita come PDGF-R, VEGF-R2, recettore dell'insulina e EGFR [18].

Oltre ad innescare questa complessa cascata di segnali, il cambiamento conformazionale del recettore, indotto dalla sua attivazione, recluta le GPCR chinasi (GRK), le quali fosforilano i residui di serina e treonina presenti nella parte intracellulare del GPCR. Queste modifiche reclutano delle specifiche proteine citoplasmatiche, chiamate β -arrestine, che determinano il distacco del recettore dalle relative proteine G e mediano l'endocitosi dei GPCR attraverso l'attivazione della via delle

clatrine, proteine coinvolte nella formazione delle vescicole di endocitosi. Le β -arrestine innescano quindi un processo di desensibilizzazione-internalizzazione bloccando il complesso recettore-proteine G [24]. A questo punto, il complesso internalizzato può andare incontro a due processi: essere defosforilato e riespresso sulla membrana plasmatica, oppure essere degradato in differenti compartimenti intracellulari [25] (Figura 3).

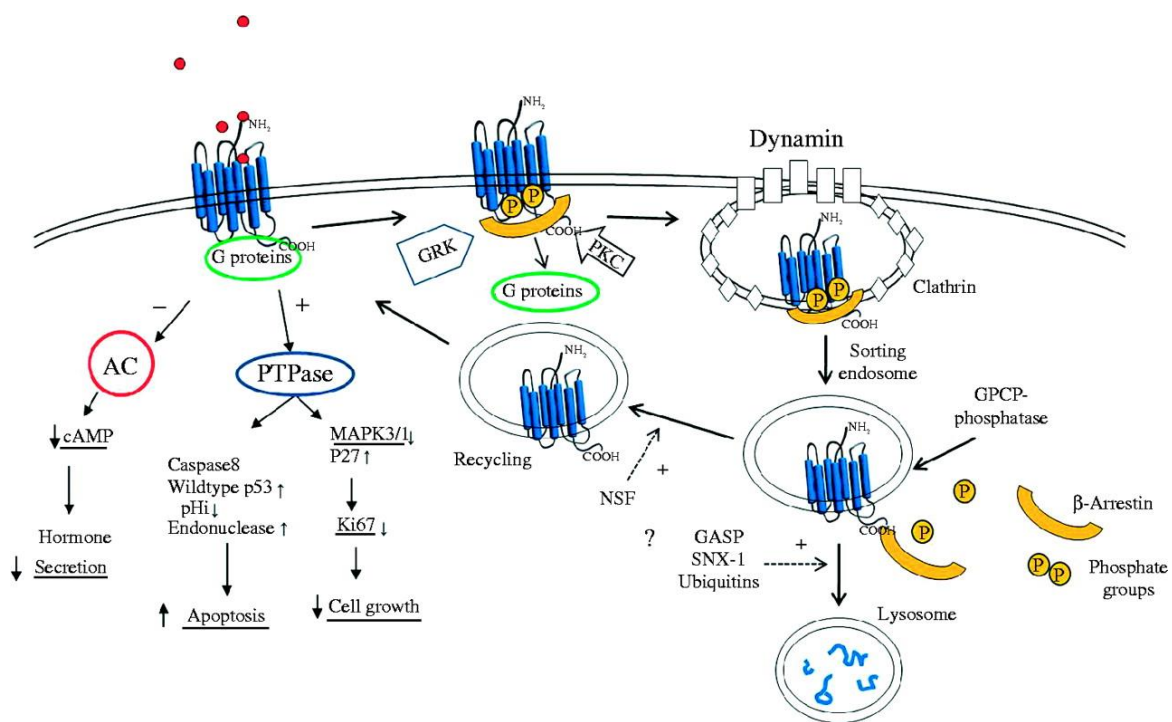


Figura 3. Rappresentazione semplificata delle principali cascate di segnalazione intracellulare associate all'attività antisecretiva, antiproliferativa ed apoptotica, indotte dal legame SRIF-SST, e alla fosforilazione, internalizzazione, degradazione e riciclo dei SST [26]. [AC, adenilato ciclasi; PTPase, fosfotirosino-fosfatasi; NSF, fattore sensibile alla *N*-etilmaleimide; GASP, proteina di smistamento associata a GPCR; SNX-1, proteina di smistamento nexina-1; pH_i, pH intracellulare].

1.3. Tumori ipofisari neuroendocrini e loro trattamento

A livello del tessuto ghiandolare ipofisario possono svilupparsi neoplasie, prevalentemente di natura benigna, definite tumori ipofisari neuroendocrini (*pituitary neuroendocrine tumor*, pitNET). Queste neoplasie rappresentano circa il 15% dei tumori intracranici [27] e raramente possono presentare comportamento invasivo, aggressivo o maligno con sviluppo di metastasi [28].

Clinicamente queste neoplasie vengono distinte, in rapporto alla secrezione ormonale, in tumori funzionanti, se determinano un aumento dei livelli plasmatici di uno specifico ormone ipofisario (tumori GH-, PRL-, ACTH-, TSH-, FSH- e LH-secerenti) e tumori non funzionanti (*non-functioning pituitary adenomas*, NFPAs) se non modificano la normale concentrazione plasmatica degli ormoni ipofisari; in base alle loro dimensioni, in microadenomi, se presentano un diametro <10 mm, e macroadenomi se il diametro è >10 mm; in base all'infiltrazione delle strutture adiacenti, in invasivi e non invasivi [28] (Figura 4).

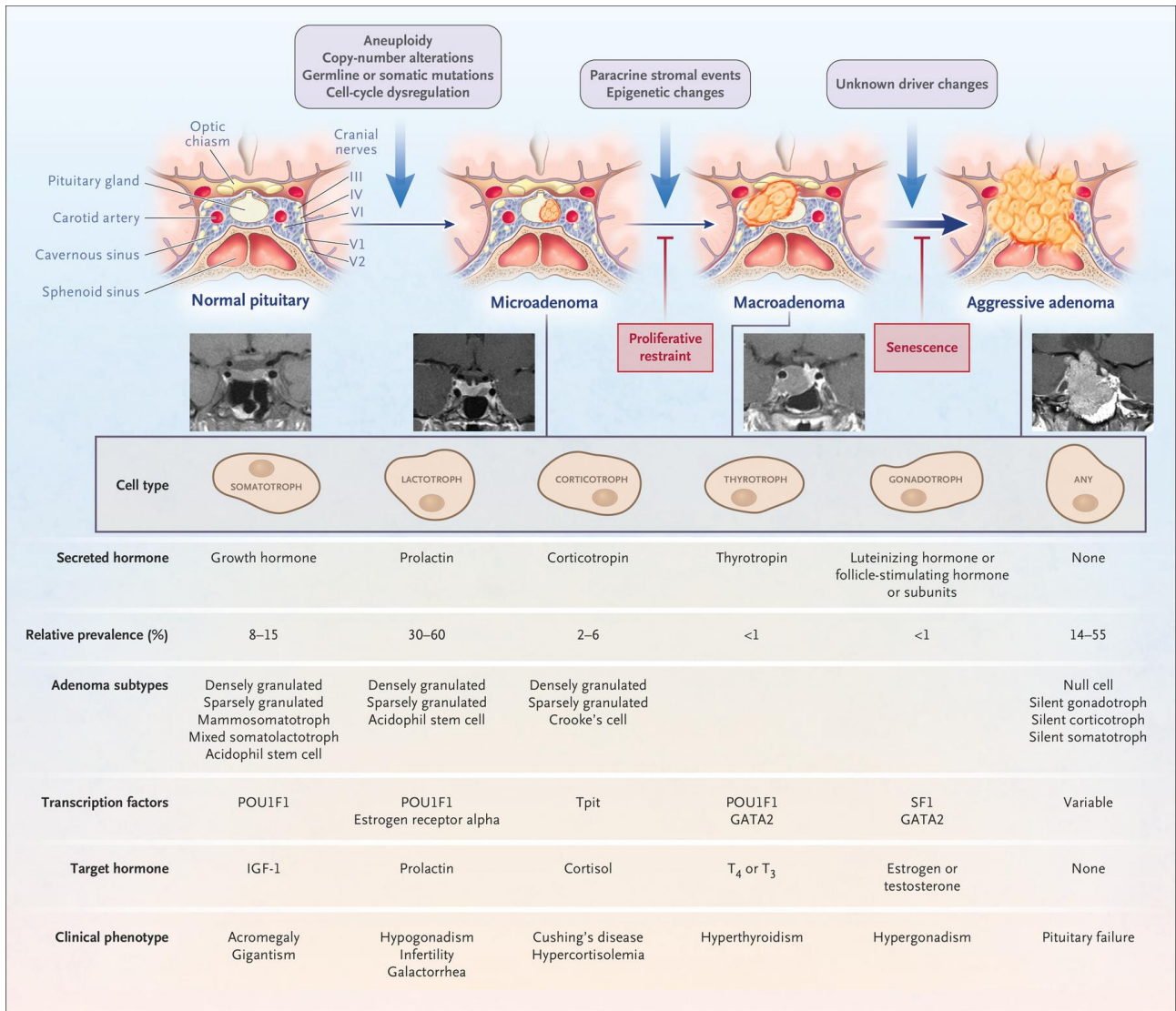


Figura 4. Patogenesi dei tumori ipofisari [27]. I tumori ipofisari hanno origine da una cellula differenziata che esprime uno, nessuno o più ormoni. Il fenotipo clinico è determinato dalla cellula di origine e dalla presenza o assenza di ipersecrezione ormonale. La prevalenza dei differenti sottotipi tumorali è stimata.

Secondo la classificazione del 2017 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, *World Health Organization*), i pitNET vengono distinti in rapporto alle cellule progenitrici dalle quali hanno origine le diverse tipologie di tumori. Possiamo quindi identificare lesioni che esprimono il fattore di trascrizione POU1F1 (o Pit-1), riscontrabile nei progenitori delle cellule somatotrope, lattotrope e tireotrope; tumori che presentano il fattore SF-1, che regola il differenziamento cellulare gonadotropo; oppure neoplasie che esprimono il fattore di trascrizione T-pit, che guida il

differenziamento corticotropo. Le linee lattotrope e tireotrope sono associate, rispettivamente, all'espressione del recettore per gli estrogeni (ER) e del fattore di trascrizione GATA2 [29].

Inoltre, alcuni pitNET sono in grado di secernere più ormoni contemporaneamente, come ad esempio i tumori somatomammotropi, caratterizzati dalla co-localizzazione di GH e PRL nelle stesse cellule, mentre altri pitNET si definiscono clinicamente silenti in quanto non secernono alcun ormone pur presentando immunoreattività per determinati ormoni, come ACTH o GH [27,28].

Infine, nel 2013 Trouillas e colleghi hanno proposto una classificazione clinicopatologica dei pitNET che prende in considerazione il diametro del tumore, l'istotipo e il grading basato su invasività e proliferazione. L'invasività viene valutata sulla base dei segni istologici e/o radiologici (alla risonanza magnetica della sella turcica) di invasione del seno cavernoso o sfenoidale, mentre la proliferazione viene determinata in base alla presenza di almeno 2 su 3 marker di proliferazione (numero di mitosi >2 per 10 *high power fields* (HPF), Ki-67 maggiore o uguale al 3%, positività per p53 presente in >10 nuclei per 10 HPF). Considerando questi parametri, questa classificazione suddivide i pitNET in 5 gradi: 1a, tumore non invasivo e non proliferativo; 1b, tumore non invasivo e proliferativo; 2a, tumore invasivo e non proliferativo; 2b, tumore invasivo e proliferativo; 3, tumore metastatico (metastasi cerebrospinali o sistemiche) [30].

Dal punto di vista istologico e citologico, i differenti sottotipi di pitNET vengono classificati, in base alla colorazione all'ematossilina-eosina, in acidofili, basofili o cromofobi e, in base alla distribuzione dei granuli, in sparsamente o densamente granulati [31].

Tra i vari marcatori espressi sul tessuto ghiandolare ipofisario, sia normale che tumorale, sono presenti anche i SST. In particolare, a livello del tessuto ipofisario tumorale, i sottotipi recettoriali maggiormente espressi sulle cellule adenomatose sono SST₂ e SST₅, seguiti da SST₁ e SST₃ [32-35] e questa condizione rappresenta il razionale per l'utilizzo degli analoghi della somatostatina (*somatostatin receptor ligands*, SRL) nel trattamento medico dei pitNET.

Infatti, se nella maggior parte dei casi il trattamento di prima linea è rappresentato dalla rimozione chirurgica della lesione mediante adenomectomia transfenoidale, soprattutto nei pazienti che presentano una massa tumorale superiore ai 10 mm, un'estensione extrasellare, oppure effetto massa dovuto ad una compressione delle strutture anatomiche circostanti da parte del tumore [27], nel caso in cui il trattamento chirurgico non sia indicato oppure si presenti una recidiva di malattia, è previsto un trattamento medico (trattamento di seconda linea) basato sull'utilizzo degli SRL. Questi composti sintetici, disegnati basandosi sulla struttura primaria della SRIF, sono metabolicamente stabili e con emivita più lunga rispetto alla SRIF endogena, la quale non è utilizzabile nella pratica clinica [36].

Gli SRL di prima generazione sono octapeptidi con struttura ciclica in cui è sempre presente il ponte disolfuro, già presente nella SRIF endogena, e che presentano il D-Trp al posto del Trp per aumentarne la stabilità. Tra gli SRL di prima generazione, il primo octapeptide che è stato sviluppato è l'octreotide (OCT) [37], con emivita di 90-120 minuti dopo somministrazione sottocutanea, seguito dal lanreotide (LAN) [38], con emivita plasmatica simile (Figura 5). Entrambi i composti hanno elevata affinità di legame per SST₂, il sottotipo recettoriale maggiormente espresso nel tessuto ipofisario [32-35]. OCT presenta anche una moderata affinità per SST₅ e una debole affinità per SST₃, mentre LAN possiede un'affinità per SST₅ superiore all'OCT. Contrariamente alla molecola endogena, entrambi i composti non legano SST₁ e SST₄ [8].

Attraverso l'interazione ligando-recettore, gli SRL esercitano un effetto antisecretivo, antiproliferativo ed apoptotico in molti tessuti tumorali [7,39-41], rappresentando uno strumento fondamentale nella terapia dei pitNET.

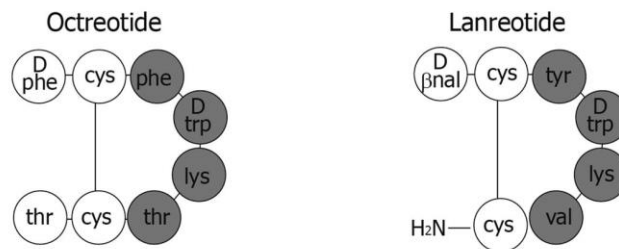


Figura 5. Sequenza amminoacidica di OCT e LAN [42].

Ad oggi sta emergendo il concetto secondo il quale la miglior risposta farmacologica potrebbe essere raggiunta attraverso l'attivazione simultanea di tutti i sottotipi di SST. Sulla base di questo principio, sono stati sviluppati composti di seconda generazione in grado di legare più recettori contemporaneamente, come il pasireotide (PAS).

Dal punto di vista strutturale, il PAS è un cicloesapeptide con un'emivita di circa 24 ore, anch'esso sintetizzato sulla base della struttura della SRIF nativa (Figura 6), e presenta un'elevata affinità di legame per tutti i SST tranne SST₄ (SST₅ > SST₂ > SST₃ > SST₁) nell'ordine della concentrazione nanomolare: SST₅ (IC₅₀: 0.2 nM), SST₂ (IC₅₀: 1 nM), SST₃ (IC₅₀: 1.5 nM) e SST₁ (IC₅₀: 9.3 nM) [43].

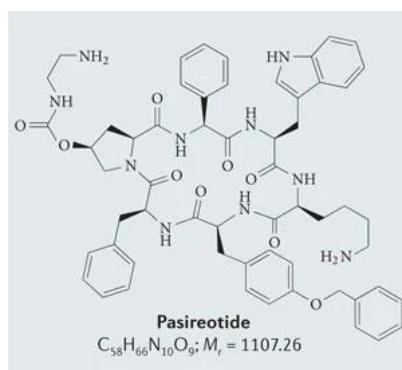


Figura 6. Sequenza amminoacidica del PAS [44].

In relazione alla sua elevata affinità di legame, in particolare per SST₅, il PAS è stato approvato dall'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) e dalla Food and Drug Administration (FDA)

per l'utilizzo nella pratica clinica dei pitNET ACTH-secernenti caratterizzati da una elevata espressione di questo sottotipo recettoriale.

Diversi studi hanno dimostrato che, oltre alle diverse affinità per i vari SST, gli SRL di prima e seconda generazione mostrano proprietà funzionali distinte. In dettaglio, il PAS si distingue dai precedenti analoghi in quanto attiva vie di trasduzione di segnale intracellulare diverse, ed agisce inoltre in maniera differente sul processo di internalizzazione dei SST.

Per quanto riguarda l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale intracellulare, a seguito del loro legame con il recettore SST_{2A}, OCT e LAN attivano le medesime vie attivate dalla molecola naturale, che portano ad un'inibizione dell'enzima adenilato ciclasi (AC) e ad un aumento del Ca²⁺ intracellulare e della fosforilazione di ERK. Analogamente a OCT e LAN, il PAS inibisce l'enzima AC ma, in alcuni modelli cellulari, antagonizza gli altri due effetti biologici [45].

Per quanto riguarda i fenomeni di internalizzazione, è stato dimostrato che i SST possono andare incontro ad un fenomeno definito desensitizzazione dopo esposizione agli SRL. Questo processo, dovuto al disaccoppiamento del recettore dalle proteine G, risulta fisiologicamente presente in seguito all'esposizione acuta agli SRL, mentre un'esposizione a lungo termine può portare alla diminuzione della risposta al trattamento dovuta ad una down-regolazione dei SST [25]. A questo proposito il PAS, a differenza di LAN e OCT, porta ad una minor internalizzazione, dovuta, in parte, sia ad un diverso stato di fosforilazione della regione C-terminale del recettore, sia ad un più rapido recycling recettoriale [46-48]. Per queste caratteristiche il PAS, rispetto alla SRIF nativa ed agli SRL di prima generazione, è definito "biased agonist" di SST₂.

Infine, allo scopo di comprendere meglio l'importanza di ciascun sottotipo recettoriale nel contesto tissutale in cui si trova, sono stati sviluppati nuovi composti sperimentali (BIM) con funzione agonista o antagonista, al momento testati solo *in vitro*, che presentano affinità selettiva per uno o più SST contemporaneamente.

1.4. Tumori ipofisari GH-secernenti

In una alta percentuale di casi (superiore al 95%), i tumori ipofisari GH-secernenti determinano nell'adulto acromegalia, una sindrome sistemica grave [27] caratterizzata da elevati livelli plasmatici di GH e, di conseguenza, di IGF-I (*insulin-like growth factor-1*). Questa condizione si associa ad un incremento della morbilità e della mortalità in questi pazienti [27] e, per questo motivo, lo scopo principale nella gestione dell'acromegalia è il raggiungimento della normalizzazione dei livelli di IGF-I per età e dei valori di GH (GH <1 µg/L o <2.5 µg/L, in base alla sensibilità dei metodi utilizzati) [7,49].

Nella maggior parte dei pazienti acromegalici il trattamento di prima linea è rappresentato dalla terapia chirurgica, mediante adenomectomia transfenoidale, mentre la terapia medica viene utilizzata nei casi in cui la chirurgia sia sconsigliata (o il paziente la rifiuti) e nei casi di patologia persistente e/o di recidiva [50].

Ad oggi, il trattamento medico di prima linea nei pazienti acromegalici è rappresentato dall'utilizzo degli analoghi della somatostatina di prima generazione (*first generation somatostatin receptor ligands*, fg-SRL), OCT e LAN [7,51,52]. Come detto in precedenza, entrambi i farmaci presentano un'affinità preferenziale per SST₂, recettore maggiormente espresso nei tumori ipofisari GH-secernenti [15,53]. A supporto dell'utilità di questi SRL nel trattamento dell'acromegalia, diversi studi hanno dimostrato una correlazione positiva tra l'espressione di SST₂ in questi tumori e l'efficacia dei fg-SRL nel ridurre la secrezione ormonale sia *in vitro* che *in vivo* [54-59].

Tuttavia, nonostante l'espressione relativamente elevata di SST₂ nei tumori somatotropi, è stato evidenziato che circa la metà dei pazienti acromegalici rispondono solo parzialmente (o sono completamente resistenti) alla terapia con fg-SRL [60].

Come riportato nell'introduzione, recentemente è stato sviluppato il PAS, un panligando utilizzato come farmaco di prima linea nel trattamento dei pitNET ACTH-secerenti con una elevata affinità per SST₅ (SST₅ > SST₂ > SST₃ > SST₁) [15,43] e, da qualche anno, approvato anche nella pratica clinica dell'acromegalia [43,51].

Considerate le caratteristiche biochimiche di questo composto e l'elevata percentuale di fallimento terapeutico associato all'utilizzo dei fg-SRL, ad oggi, le linee guida internazionali per il trattamento dell'acromegalia hanno introdotto il PAS, come farmaco di seconda linea, nei pazienti che mostrano una risposta parziale ai fg-SRL [7,51].

Diversi autori hanno comparato l'efficacia di OCT e PAS *in vivo*, mostrando che il PAS è stato più efficace rispetto ad OCT nel normalizzare i livelli di IGF-I ed ugualmente efficace nel normalizzare i livelli di GH [61]. In linea con questi risultati, alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato che OCT e PAS hanno un'efficacia complessivamente sovrapponibile nel ridurre la secrezione di GH in colture primarie di tumori somatotropi [55,62,63]. Inoltre, in alcuni di questi, l'effetto inibitorio di PAS sembra essere direttamente correlato all'espressione di SST₂ (e non di SST₅) sulle cellule tumorali [55,63]. In accordo con questi dati, uno studio recente ha mostrato che l'effetto del PAS *in vivo* è prevalentemente mediato dall'espressione di SST₂ nei pazienti acromegalici che rispondono parzialmente ai fg-SRL [64].

Al contrario, altri autori supportano l'ipotesi secondo la quale SST₅ giochi un ruolo predominante nel mediare gli effetti del PAS nei tumori somatotropi, basandosi sulla sua affinità di legame per il recettore [65,66]. Su questo argomento il dibattito è ancora aperto, anche se attualmente le evidenze suggeriscono che nell'acromegalia il PAS eserciti la sua attività biologica attraverso SST₅ solo nei tumori che presentano un'espressione di SST₂ bassa (o nulla) [63-65].

Inoltre, altri studi *in vitro*, prevalentemente condotti su cellule transfettate con i SST, suggeriscono che il PAS possa agire come un "biased agonist" su SST₂, in quanto determina una

differente internalizzazione recettoriale, un diverso trafficking, così come diversi effetti sull'accumulo di calcio intracellulare e sulla fosforilazione di ERK1/2 (agonista parziale/antagonista), rispetto ad OCT e alla SRIF endogena [45-47].

Pertanto, sulla base delle differenti caratteristiche biochimiche e funzionali attribuite al PAS, un trattamento in combinazione con un composto che presenti un'affinità prevalente per SST₂, come OCT, potrebbe fornire informazioni utili su un possibile effetto sinergico/additivo dei due composti nelle cellule di pitNET GH-secernenti.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare un potenziale effetto additivo e/o sinergico del trattamento combinato con OCT (SRL di prima generazione) e PAS (SRL di seconda generazione) sulla secrezione di GH in cellule somatotrope (colture primarie di tumori ipofisari umani), confrontandolo con l'effetto prodotto da OCT e PAS testati singolarmente. L'effetto inibitorio dei due composti, da soli o in combinazione, sul rilascio di GH *in vitro*, è stato successivamente correlato all'espressione di SST₂ e SST₅ presente nei tessuti di questi tumori.

Inoltre, per chiarire meglio i meccanismi intracellulari che sono alla base dell'attività biologica di OCT, PAS e della loro combinazione, è stata utilizzata la linea cellulare GH4C1 come modello dei tumori somatotropi [67]. In questo contesto, abbiamo studiato gli effetti dei due SRL sulla proliferazione cellulare, così come sulla concentrazione di calcio intracellulare e sulla sintesi di cAMP, che rappresentano le principali vie di trasduzione del segnale intracellulare a valle dei SST coinvolti nella modulazione del rilascio ormonale nelle cellule neuroendocrine [9,68]. Infine, l'utilizzo di un antagonista selettivo per SST₂, il BIM-23627, da solo o in associazione con OCT e PAS, ci ha consentito di identificare il ruolo di SST₂ nelle risposte osservate.

3. MATERIALI E METODI

3.1. *Composti*

Octreotide (OCT), composto con affinità maggiore per SST₂, e pasireotide (PAS), ligando in grado di legare tutti i SST (escluso SST₄), sono stati forniti da Novartis Pharma A.G. (Basel, Svizzera). Mentre l'antagonista selettivo per SST₂, BIM-23627, è stato messo a disposizione da Biomeasure Incorporated/IPSEN (Milford, Massachusetts).

3.2. *Pazienti e tumori*

Nello studio sono stati inclusi 11 pazienti acromegalici, che sono stati sottoposti ad adenomectomia mediante chirurgia trans-sfenoidale presso l'Unità di Neurochirurgia del nostro centro (IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italia).

I criteri di inclusione dello studio erano: 1) disponibilità di una quantità sufficiente di cellule vive in modo da poter allestire una coltura primaria; 2) numero adeguato di cellule per poter testare, in un unico esperimento, almeno in triplicato, l'effetto antisecretivo di OCT e PAS (da soli o in combinazione) dopo 72 ore di trattamento; e 3) disponibilità dei tessuti tumorali paraffinati per poter eseguire l'immunoistochimica sia per SST₂ che per SST₅.

L'unico criterio di esclusione, basato sulle caratteristiche dei pazienti o dei tumori, è stato quello di considerare non idonei allo studio i campioni di pazienti sottoposti a radioterapia prima dell'intervento chirurgico.

La diagnosi di acromegalia è stata basata sulle caratteristiche cliniche, sulle evidenze biochimiche di ipersecrezione di GH (perdita di soppressione del GH al di sotto di 1 µg/L dopo 2

ore dal carico orale di glucosio), sui livelli di IGF-1 al di sopra del limite superiore di normalità per età (>1 xULN), e sulla presenza di un adenoma ipofisario alla risonanza magnetica (MRI).

Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche generali, cliniche e biochimiche dei pazienti e le informazioni istopatologiche dei tumori.

Tabella 1. Caratteristiche generali, cliniche e biochimiche dei pazienti al momento dell'intervento e informazioni istopatologiche dei tumori.

Paziente no.	Caratteristiche dei pazienti					Caratteristiche dei tumori						
	Sesso, Età (anni)	GH $\mu\text{g/L}$	IGF-1 $\mu\text{g/L}$	IGF-1 xULN	SRL Pre-intervento	Dimensione del tumore	Ki-67	Mitosi (n/10 HPF)	p53 (+nuclei/10 HPF)	Indice di proliferazione ^a	SST ₂ (IRS)	SST ₅ (IRS)
1	M, 54	2.7	454	2.02	Yes	micro	<3%	0/10	6/10	0	9	6
2	F, 54	8.4	453	1.90	Yes	macro	<3%	0/10	2/10	0	8	8
3	M, 49	10.9	394	1.53	No	micro	<3%	0/10	13/10	1	12	9
4	M, 54	13.9	509	2.50	No	macro	<3%	1/10	0/10	0	12	12
5	M, 39	62.0	989	4.10	No	macro	<3%	0/10	0/10	0	8	12
6	F, 52	15.2	833	3.30	No	macro	<3%	0/10	5/10	0	12	1
7	F, 21	51.1	858	2.30	No	macro	<3%	0/10	2/10	0	8	4
8	M, 16	11.8	562	0.93	Yes	macro	\geq 3%	3/10	13/10	3	4	1
9	M, 50	8.0	469	1.89	No	macro	<3%	0/10	4/10	0	12	8
10	M, 57	14.0	571	2.86	No	macro	\geq 3%	8/10	>10/10	3	6	4
11	F, 39	7.9	436	1.80	No	macro	<3%	2/10	9/10	0	6	1

Legenda: F, femmina; M, maschio; ULN, limite superiore di normalità; SRL, analoghi dei recettori della somatostatina; HPF, campi ad alto ingrandimento; IRS, immunoreactivity score; micro, microadenoma (massimo diametro <10 mm); macro, macroadenoma (massimo diametro \geq 10 mm). ^aIndice di proliferazione basato sulla classificazione proposta da Trouillas e colleghi [30]. Le lesioni vengono definite altamente

proliferative in presenza di almeno due su tre dei seguenti criteri: Ki-67: ≥ 3 %, mitosi: $n > 2/10$ HPF, p53: positiva (10 nuclei fortemente positivi/10 HPF).

In breve, 4 pazienti (36.4%) erano di sesso femminile e 7 di sesso maschile (63.6%), l'età media al momento dell'intervento era 44.1 anni (intervallo d'età 16-57). La maggior parte dei pazienti aveva un macroadenoma (9/11, 81.8%), sebbene molte lesioni mostrassero un indice di proliferazione basso (9 su 11 casi, in accordo con la definizione di Trouillas e colleghi [30]). Infatti, basandosi sulla valutazione patologica, solo i pazienti n.8 e n.10 avevano una lesione aggressiva (Tabella 1).

Tre pazienti (27.3%) avevano ricevuto trattamento medico con fg-SRL per almeno tre mesi prima dell'intervento (octreotide LAR o lanreotide Autogel) (Tabella 1). I pazienti n.1 e n.2 avevano mostrato una riduzione dei livelli di IGF-1 pari al 68% e al 48%, rispettivamente, nonostante non avessero ottenuto la normalizzazione dell'IGF-I (≤ 1 xULN). Per quanto riguarda il paziente n.8, si era rivolto al nostro centro dopo aver iniziato il trattamento pre-intervento con SRL, e di conseguenza i valori di IGF-1 alla diagnosi non sono disponibili.

All'ultimo controllo biochimico prima dell'adenomectomia, i livelli di GH erano 18.72 ± 19.19 $\mu\text{g/L}$ (media \pm SD, mediana 11.80 $\mu\text{g/L}$), mentre i livelli di IGF-1 (espressi come rapporto rispetto al limite superiore di normalità per età, ULN) erano 2.29 ± 0.88 xULN (media \pm SD, mediana 2.02 xULN). I valori assoluti di IGF-1 erano 593.5 ± 202.9 $\mu\text{g/L}$ (media \pm SD, mediana 509.0 $\mu\text{g/L}$). I livelli di GH e di IGF-1 plasmatici correlavano in modo significativo e diretto (Pearson $r=0.869$, $p=0.005$).

Dopo l'intervento neurochirurgico, 4 pazienti hanno ricevuto il trattamento adiuvante con SRL (pazienti 1, 2, 5 e 6). All'ultimo follow-up la riduzione dei livelli di IGF-1 era del 40.8% (± 29.6 , mediana 44.7%), raggiungendo la normalizzazione in 3 soggetti su quattro (IGF-1 ≤ 1 xULN; pazienti 1, 2 e 6). A causa della risposta incompleta alla terapia con SRL da parte del paziente n.5, questo paziente è stato successivamente trattato con il pegvisomant, un antagonista del recettore del GH.

Dopo l'approvazione dello studio da parte del comitato etico regionale, (Institutional Ethical Committee, IEC, CER Liguria register number: 360/2019), a tutti i soggetti inclusi nello studio è stato richiesto di firmare un consenso informato.

3.3. *Immunoistochimica (IHC)*

A livello proteico, l'espressione dei SST è stata valutata nei tessuti post-chirurgici dei pazienti acromegalici fissati in formalina e inclusi in paraffina (spessore delle sezioni 5 μm) utilizzando il kit Dako EnVision®+ Dual Link System-HRP (DAB+) (Dako/Agilent, Santa Clara, California), come descritto in precedenza [58]. Per rilevare SST₂ e SST₅, sono stati utilizzati gli anticorpi monoclonali di coniglio anti-SST₂ (RRID: AB_2737601) e anti-SST₅ (RRID: AB_10859946) (UMB-1 e UMB-4, rispettivamente, Abcam, Cambridge, United Kingdom) alla diluizione di 1:200. Al termine della colorazione, le fettine sono state trattate con l'ematossilina per colorare i nuclei. Per valutare l'intensità della colorazione nelle fettine di tessuto tumorale e la percentuale di cellule positive è stato utilizzato il sistema "immunoreactivity score" (IRS), sistema di classificazione semiquantitativo che varia da 0 (nessuna colorazione) a 12 (massima colorazione) e rappresenta il prodotto tra la percentuale di cellule positive e l'intensità di colorazione. La percentuale di cellule positive viene valutata con valori da 1 a 4 (0, 0%; 1, <10%; 2, 10-50%; 3, 51-80%; 4, >80%) e l'intensità della colorazione con valori da 1 a 3 (1, blanda; 2, moderata; 3, forte) [58].

3.4. *Colture cellulari*

3.4.1. *Colture primarie di tumori somatotropi*

Le colture primarie sono state preparate secondo un protocollo sviluppato nel nostro laboratorio. In dettaglio, subito dopo l'intervento chirurgico, un frammento di tessuto adenomatoso è stato dissociato meccanicamente in condizioni sterili al fine di ottenere una sospensione cellulare. Questa sospensione è stata filtrata attraverso un setaccio cellulare da 70 μm e successivamente, trattata con acqua deionizzata per pochi secondi in modo tale da indurre uno shock osmotico sui globuli rossi contaminanti la coltura (se presenti in grande quantità). Le cellule così ottenute sono state messe in fiasca da 25 cm^2 in terreno Dulbecco Modified Eagles Medium (D-MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), supplementato con 10% di siero fetale di bovino (FBS), 1% di amminoacidi non-essenziali, 1% di penicillina-streptomina e 1% di L-glutammina (Euroclone S.p.A., Milano, Italia) e coltivate a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 in apposito incubatore.

3.4.2. *Linea cellulare GH4C1*

La linea cellulare di adenoma ipofisario murino GH-secernente GH4C1 (RRID: CVCL 0276) è stata ottenuta dalla ATCC (ATCC® CCL-82.2™) e fatta crescere in incubatore (37°C, 5% CO_2) in terreno D-MEM/Nutrient Mixture F-12 HAM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), supplementato con 10% di FBS, 1% di amminoacidi non-essenziali, 1% di penicillina-streptomina e 1% di L-glutammina (Euroclone S.p.A., Milano, Italia) [69].

3.5. *Secrezione di GH in vitro*

Per valutare l'effetto di OCT e PAS sulla secrezione di GH, le colture primarie sono state coltivate in triplicato in piastre da 48 pozzetti alla densità di 2×10^5 cellule/pozzetto e incubate per 72 h in assenza o presenza di OCT e PAS (da soli o in combinazione) alla concentrazione 10^{-8} M.

Le cellule GH4C1 (2×10^5 cellule/pozzetto) sono state piastrate in triplicato in piastre a 48 pozzetti in terreno completo con 10% di FBS e incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 . Dopo 24 h, il terreno è stato sostituito con D-MEM/Nutrient Mixture F-12 HAM privo di siero (0.1% BSA) e le cellule sono state incubate per ulteriori 24 h. Successivamente le GH4C1 sono state trattate con OCT e PAS, da soli o in combinazione, alla concentrazione 10^{-8}M e incubate per altre 6 e 24 h.

Al termine dell'incubazione, il terreno è stato rimosso e centrifugato per 5 minuti a $600 \times g$ e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi.

La concentrazione di GH nei terreni delle colture primarie e delle cellule GH4C1 è stata determinata mediante kit ELISA (Mediagnost, Reutlingen, Germania) per la misurazione di GH umano (RRID: AB_2813811) o di GH murino (RRID: AB_2813812), rispettivamente. I coefficienti di variazione intra- and inter-assay erano 5.46% e 4.34% per hGH ELISA Kit o <5.0 e $<10\%$ per m/rGH ELISA Kit, rispettivamente.

3.6. *Proliferazione cellulare*

Le cellule GH4C1 (3×10^4 cellule/pozzetto) sono state coltivate in triplicato in piastre a 96 pozzetti in un volume finale di $200 \mu\text{L}$ e incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 . Dopo 24 h, i terreni sono stati sostituiti con $180 \mu\text{L}$ di D-MEM/Nutrient Mixture F-12 HAM privo di siero contenente 0.1% di BSA per arrestare il ciclo cellulare in fase G₀, e le cellule sono state incubate per ulteriori 24 h. Successivamente, sono stati aggiunti OCT, PAS e BIM-23627 (10^{-8}M), da soli o in combinazione equimolare, al terreno già presente nei pozzetti fino ad un volume finale di $200 \mu\text{L}$, e le cellule sono state incubate per ulteriori 48 h. La proliferazione cellulare è stata valutata misurando l'incorporazione di BrdU nel DNA mediante il BrdU Cell Proliferation Assay Kit (Cell Signaling

Technology, Danvers, Massachusetts) secondo le istruzioni del produttore. I risultati rappresentano i valori medi di quattro distinti esperimenti, ciascuno eseguito in triplicato.

3.7. *Quantificazione dei livelli di cAMP*

Le cellule GH4C1 (6×10^5 cellule/pozzetto) sono state coltivate in piastre a 6 pozzetti, per 24 h in terreno D-MEM/Nutrient Mixture F-12 HAM completo e successivamente in terreno privo di siero per altre 24 h. Le cellule sono state quindi trattate con OCT (10^{-8} M), PAS (10^{-8} M), e BIM-23627 (10^{-8} M) per 1 h, in presenza di un inibitore delle fosfodiesterasi, il 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) alla concentrazione $1 \mu\text{M}$. La lisi cellulare e la determinazione quantitativa dell'cAMP sono state eseguite utilizzando il Parameter™ mouse/rat cAMP kit (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota), come riportato in precedenza [70]. I risultati sono stati espressi come le medie \pm SEM di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato.

3.8. *Misurazione intracellulare di $[\text{Ca}^{2+}]$*

Le cellule GH4C1 (2×10^5 cellule/pozzetto) sono state piastrate in capsule di Petri da 35 mm (Cell Imaging dishes, Eppendorf, Milano, Italia), trattate con poli-L-lisina ($10 \mu\text{g/mL}$) per favorire l'adesione cellulare. Dopo 24 h, le cellule sono state lavate con PBS e trattate con una soluzione satura di Fura-2 AM ($2 \mu\text{M}$) (Abcam, Cambridge, United Kingdom) in tampone Locke (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, KCl 5.5 mM, CaCl_2 1.5 mM, MgSO_4 1.2 mM, glucosio 10 mM) per 20 minuti a temperatura ambiente per evitare la compartimentalizzazione intracellulare [69]. Successivamente, le cellule sono state lavate per 10 minuti con la stessa soluzione salina e, dopo 5 minuti, sono state trattate con OCT (10^{-8} M) e PAS (10^{-8} M), quindi infuse con KCl alla concentrazione 40 mM per indurre il flusso di Ca^{2+} [71].

L'emissione della fluorescenza è stata registrata grazie ad una videocamera digitale collegata ad un sistema di registrazione d'immagine (FAB Crea, Genova, Italia). Successivamente le immagini sono state analizzate con il software ImageJ Fiji (ROI tool). I dati sono stati calcolati come rapporto tra le letture a 340 nm e 380 nm (340/380 nm) analizzando 20 cellule per campo in cinque esperimenti indipendenti.

3.9. Immunocitofluorescenza (IF)

Le cellule GH4C1 (2×10^4 cellule/pozzetto) sono state piastrate su appositi vetrini a 8 pozzetti (BD Bioscience, San Jose, California) a 37°C in atmosfera al 5% di CO_2 per 48 h e starvate per 24 h in terreno privo di siero. Le cellule sono state trattate con una soluzione contenente il colorante Vybrant™ DiI (Invitrogen, Carlsbad, California) che colora in arancione-rosso il doppio strato lipidico della membrana cellulare e successivamente incubate con OCT o PAS (10^{-7} M) per 20 minuti, lavate con PBS e fissate con la paraformaldeide al 4% per 10 minuti. I vetrini sono stati processati come descritto precedentemente [72] e incubati con due anticorpi monoclonali anti-SST₂ e SST₅ (Abcam, Cambridge, United Kingdom), a temperatura ambiente per 1 h (diluizione 1:200) [73]. I vetrini sono stati lavati e quindi incubati con un anticorpo coniugato al fluorocromo (goat anti-rabbit Alexa Fluor-488; RRID: AB_2633280; Invitrogen, Carlsbad, California). In tutti gli esperimenti sono stati inclusi i controlli negativi processati con l'esclusione degli anticorpi primari. I vetrini coprioggetto sono stati montati con il ProLong™ Gold Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts). I campioni sono stati visualizzati e fotografati al microscopio confocale (BioRad MRC 1024 ES).

3.10. Estrazione di RNA e PCR quantitativa (qRT-PCR)

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule GH4C1 utilizzando l'Aurum™ total RNA Mini Kit e retrotrascritto utilizzando l'iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, California). Il cDNA è stato amplificato con il BioRad's SsoFast™ EvaGreen supermix grazie al sistema di rivelamento CFX96 RT-PCR (BioRad, Hercules, California). Le sequenze dei primer forward e reverse per i recettori murini SST₁₋₅ [74], così come per i geni housekeeping, sono stati sintetizzati da TIB MolBiol (Genova, Italia). In ogni campione, i livelli dei geni valutati sono stati normalizzati sulla base dell'amplificazione dei geni housekeeping e riportati come valori relativi [75]. In tutte le reazioni di RT-PCR sono stati inclusi i controlli negativi privi, rispettivamente, di mRNA e di cDNA al fine di escludere eventuali contaminazioni dei reagenti.

3.11. Western Blotting

Le cellule GH4C1 (5x10⁶ cellule) sono state fatte crescere in fiasche da 150 cm² in terreno completo. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state solubilizzate per estrarre le proteine di membrana e il contenuto proteico è stato analizzato mediante immunoblot, come descritto in precedenza [22]. Per valutare l'espressione dei SST nelle cellule GH4C1, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi policlonali: anti-SST₁, anti-SST₂ e anti-SST₅ (RRID: AB_2196045, RRID: AB_2255396 e RRID: AB_2196380, rispettivamente; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas) alla diluizione di 1:500. La β -actina è stata rilevata mediante incubazione con un anticorpo anti- β -actina direttamente coniugato alla perossidasi HRP (RRID: AB_2714189; Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Dallas, Texas; diluizione 1:10,000). Le bande proteiche sono state visualizzate con il Sistema in chemiluminescenza ECL (GE Healthcare, Chicago, Illinois) e analizzate mediante acquirente di immagini (UVITEC Alliance, UVITEC, Cambridge, United Kingdom).

3.12. *Calcolo dell'indice di combinazione*

L'interazione tra gli effetti di octreotide e pasireotide è stata analizzata utilizzando il 'median-effect method' [76,77], ed è stata espressa come indice di combinazione (CI). Il CI descrive la natura dell'interazione farmaco-farmaco che può essere additiva (CI = 1), antagonista (CI > 1), oppure sinergica (CI < 1) per diverse concentrazioni [78]. I valori di CI sono stati calcolati utilizzando il software CompuSyn (ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA), seguendo il metodo di Chou e Talalay [76].

3.13. *Analisi statistica*

I risultati sono stati espressi come la media \pm la deviazione standard (SD) per i dati relativi ai pazienti e ai rispettivi campioni tumorali, mentre sono stati espressi come la media \pm l'errore standard (SEM) per gli esperimenti ripetuti eseguiti sulla linea cellulare GH4C1. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando la versione 6.0 del software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, California). Dopo aver eseguito il test di normalità, per l'analisi delle differenze tra gruppi sono stati utilizzati la one-way ANOVA seguita dal post-hoc test di Newman-Keuls o il test di Kruskal-Wallis seguito dal Dunn's post-hoc test. I coefficienti di correlazione sono stati calcolati utilizzando la r di Pearson (dati distribuiti normalmente). La significatività statistica è stata stabilita con $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1. *Espressione proteica dei SST nei campioni di tumore ipofisario*

L'immunoistochimica eseguita su sezioni di tessuto tumorale paraffinato ha mostrato la presenza di SST₂ e SST₅ in tutti i tumori somatotropi analizzati, anche se con livelli di espressione eterogenei (Figura 7, pannello A). L'analisi semi-quantitativa dell'espressione di SST₂ e SST₅ in tutti i tessuti ipofisari (n=11), ha evidenziato un *immunoreactivity score* (IRS) con mediana intermedio-alta per SST₂ (IRS=8) e mediana intermedia per SST₅ (IRS=6) (Figura 7, pannello B). In dettaglio, 1 campione (paziente 8) mostrava uno *score* intermedio per SST₂ (IRS=4), 6 campioni (pazienti 1, 2, 5, 7, 10 e 11) un'espressione intermedio-alta per SST₂ (IRS tra 6 e 9), mentre 4 campioni (pazienti 3, 4, 6 e 9) presentavano lo *score* massimo (IRS=12). Per quanto riguarda l'espressione di SST₅, 3 campioni (pazienti 6, 8 e 11) mostravano uno *score* basso (IRS=1), 2 campioni (pazienti 7 e 10) presentavano uno *score* intermedio (IRS=4), 4 campioni (pazienti 1, 2, 3 e 9) mostravano un'espressione per SST₅ intermedio-alta (IRS tra 6 e 9), e due campioni (pazienti 4 e 5) hanno ricevuto lo *score* massimo (IRS=12).

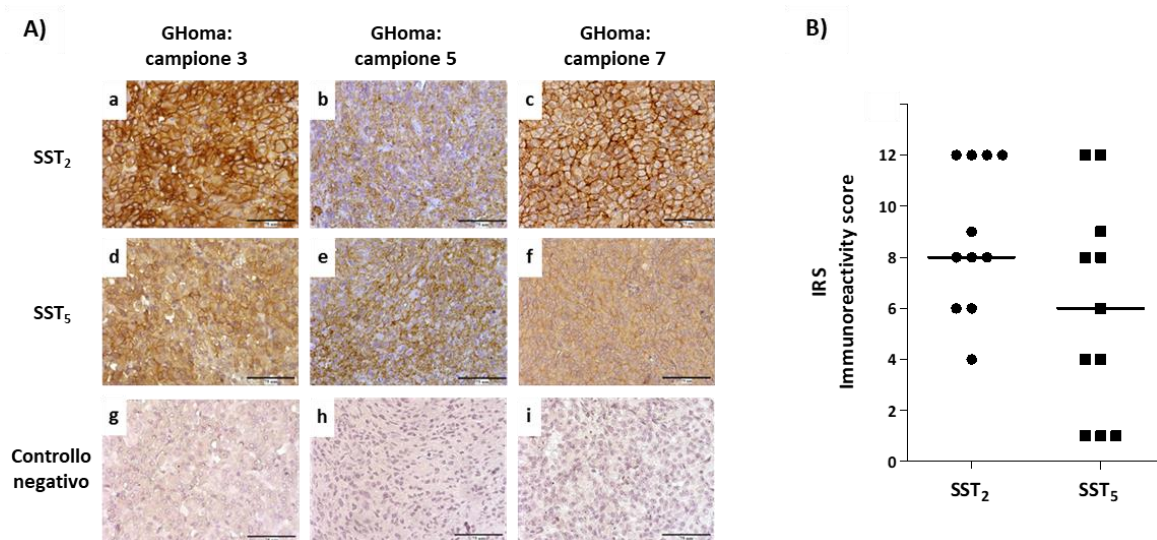


Figura 7. Valutazione immunoistochimica di SST₂ e SST₅ nei tumori ipofisari somatotropi. Pannello A) IHC rappresentativa di SST₂ e SST₅ in tre GHomi differenti (scala, 75µm): (a) IRS elevato per SST₂ nel campione 3 (IRS 12); (b,c) IRS intermedio-alto per SST₂ nei campioni 5 e 7 (IRS 8); (d) IRS intermedio-alto per SST₅ nel campione 3 (IRS 9); (e) IRS alto per SST₅ nel campione 5 (IRS 12); (f) IRS intermedio per SST₅ nel campione 7 (IRS 4); (g,h,i) controlli negativi processati in assenza di anticorpi primari. Pannello B) Scatter plot dell'IRS di SST₂ e SST₅ di tutti i campioni (n=11) e linea mediana.

In generale, l'immunoreattività per SST₂ e SST₅ è risultata essere più elevata nei tumori dei pazienti che non erano stati sottoposti a trattamento con SRL prima dell'intervento chirurgico rispetto ai campioni provenienti da pazienti non pretrattati (Tabella 1), anche se questa differenza non ha raggiunto significatività statistica (SST₂ p=0.21, e SST₅ p=0.65). Infine, non è stata trovata alcuna correlazione tra l'IRS di SST₂ e l'IRS di SST₅ (r=0.49, p=0.13).

4.2. Effetto di OCT e PAS sulla secrezione di GH nelle cellule somatotrope umane

L'effetto di OCT e PAS (10^{-8} M) sulla secrezione di GH è stato testato in colture primarie ottenute da tutti i tumori somatotropi inclusi in questo studio (n=11). Nel complesso, OCT e PAS, da soli o in combinazione, hanno ridotto significativamente la secrezione di GH, rispetto alle cellule non trattate (OCT: $-35.4\% \pm 11.1$, PAS: $-32.1\% \pm 14.4$, OCT+PAS: $-33.5\% \pm 17.0$; n=11, $p < 0.001$ vs. controllo). L'effetto inibitorio dei due farmaci è risultato sovrapponibile e la loro combinazione ha mostrato un'efficacia simile a ciascun singolo trattamento (Figura 8, pannello A). È interessante notare che da due colture primarie (pazienti n. 10 e 11) sono state generate anche le curve dose-risposta (da 10^{-9} a 10^{-7} M) dalle quali è stato possibile analizzare l'interazione farmacologica tra OCT e PAS calcolando l'indice di combinazione (CI) (Figura 8, pannello B). Il valore di CI ottenuto (1.74) è indicativo di un moderato effetto antagonista da parte della combinazione OCT+PAS (nessun effetto sinergico né additivo).

Sulla base della risposta individuale di ogni coltura cellulare, OCT è stato in grado di indurre una riduzione della secrezione di GH maggiore del 20% in 10/11 casi, PAS in 9/11 colture cellulari e OCT+PAS in 8/11 campioni (Figura 8, pannello C).

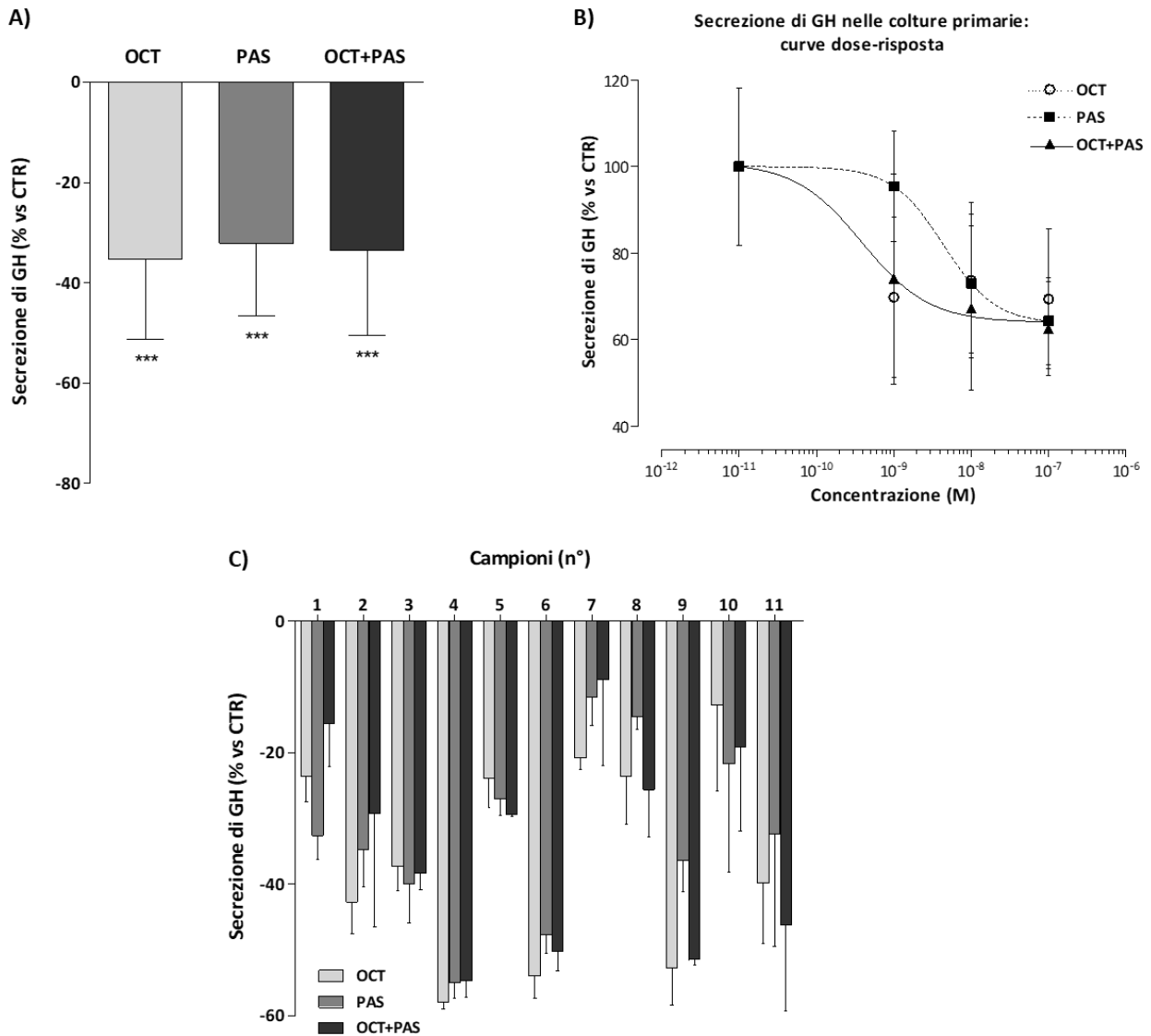


Figura 8. Effetto *in vitro* di OCT (10^{-8} M) e PAS (10^{-8} M), da soli o in combinazione, sulla secrezione di GH in 11 colture primarie di tumori somatotropi. Pannello A) Efficacia complessiva di OCT, PAS e OCT+PAS dopo 72 ore di trattamento. Pannello B) Curve dose-risposta sulla secrezione di GH in due colture cellulari primarie dopo 72 h di trattamento con OCT, PAS e OCT+PAS (dalla concentrazione 10^{-9} M alla 10^{-7} M). La sovrapposizione delle curve di OCT e OCT+PAS è dovuta all'efficacia sovrapponibile dei due trattamenti sulla secrezione di GH. Pannello C) Effetto antisecretivo dettagliato di OCT, PAS e OCT+PAS nelle differenti colture cellulari. I dati sono espressi come la media \pm SD di ogni esperimento, eseguito in triplicato, e riportato come percentuale dell'inibizione rispetto al controllo. [CTR, controllo; OCT, octreotide; PAS, pasireotide; ***, $p < 0.001$ vs. controllo].

L'analisi statistica dei dati ha evidenziato una inibizione della secrezione di GH indotta da OCT significativamente e direttamente correlata all'effetto inibitorio indotto da PAS ($r=0.85$, $p=0.001$) (Figura 9, pannello A). Inoltre, l'efficacia di OCT e di PAS, testati singolarmente, correlava direttamente con i risultati ottenuti testando la combinazione dei due farmaci (OCT vs. OCT+PAS: $r=0.90$, $p<0.001$; PAS vs. OCT+PAS: $r=0.81$, $p<0.01$) (Figura 9, pannelli B e C).

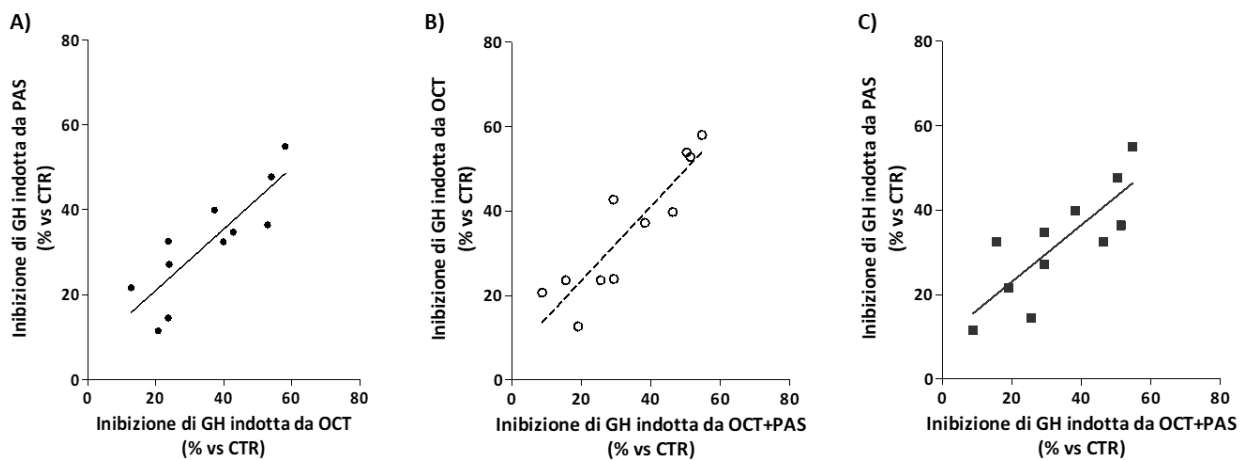


Figura 9. Correlazione tra gli effetti inibitori di OCT e PAS, da soli o in combinazione, sulla secrezione di GH. (A) Correlazione tra l'inibizione della secrezione di GH indotta da OCT e quella indotta da PAS in undici colture cellulari di tumore somatotropo. (B,C) Correlazione tra l'effetto di OCT (pannello B) e PAS (pannello C) e l'effetto inibitorio della loro combinazione sulla secrezione di GH in 11 colture cellulari adenomatose. [CTR, controllo; OCT, octreotide; PAS, pasireotide].

A supporto del ruolo predominante di SST₂ nel mediare gli effetti sia di OCT che di PAS, l'effetto inibitorio sulla secrezione di GH indotto da entrambi i composti correlava significativamente e direttamente con l'IRS di SST₂ ($r=0.71$, $p<0.05$, e $r=0.78$, $p<0.01$, rispettivamente) (Figura 10, pannello A). Al contrario, non è stata trovata alcuna correlazione tra l'efficacia dei due composti e l'IRS di SST₅ (OCT: $r=0.22$, $p=0.52$; PAS: $r=0.39$, $p=0.23$) (Figura 10, pannello B).

Infine, non è stata trovata alcuna correlazione statisticamente significativa tra l'effetto antisecretivo di OCT+PAS *in vitro* e l'IRS sia di SST₂ che di SST₅ (Figura 10, pannelli C e D), nonostante la presenza di un andamento corrispondente ad una correlazione diretta tra l'efficacia della combinazione e l'IRS di SST₂ ($r=0.57$, $p=0.063$).

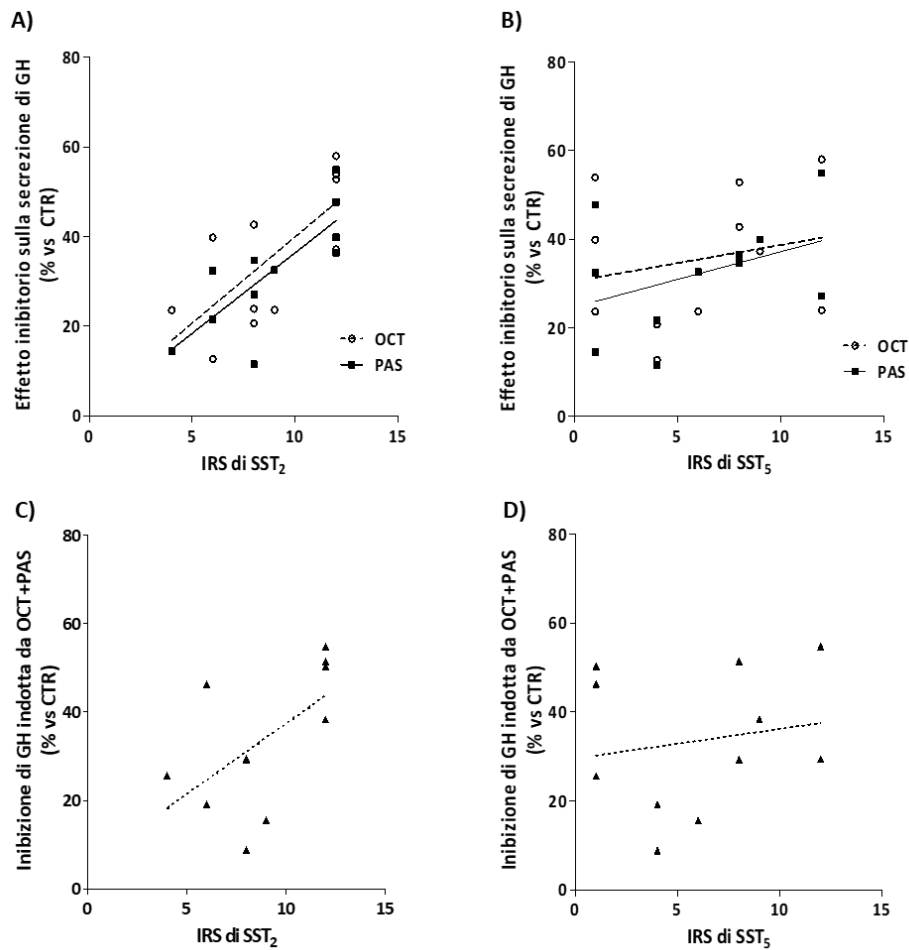


Figura 10. Correlazione tra gli effetti inibitori di OCT e PAS sulla secrezione di GH e l'espressione proteica di SST_{2/5} nei tumori somatotropi. (A,B) Correlazione tra l'IRS di SST₂ (pannello A) o l'IRS di SST₅ (pannello B) e l'effetto inibitorio di OCT e PAS sulla secrezione di GH in 11 colture cellulari adenomatose. (C,D) Correlazione tra l'IRS di SST₂ (pannello C) o l'IRS di SST₅ (pannello D) e l'inibizione della secrezione di GH indotta da OCT+PAS nelle colture cellulari di tumore ipofisario GH secernente. [CTR, controllo; OCT, octreotide; PAS, pasireotide; IRS, immunoreactivity score].

4.3. Espressione dei SST nelle cellule GH4C1

Per comprendere meglio il ruolo dei SST nella mediazione degli effetti di OCT e PAS (da soli o in combinazione) e i meccanismi intracellulari coinvolti, è stata utilizzata come modello di adenoma ipofisario GH-secerente la linea cellulare GH4C1.

L'espressione dei SST sulle GH4C1 è stata valutata sia a livello genico, mediante qRT-PCR, sia a livello proteico, mediante Western Blot. I risultati della qRT-PCR hanno rilevato l'espressione dell'mRNA per SST₁, SST₂ e SST₅, ma non per SST₃ (Figura 11, pannello A). L'analisi mediante immunoblot dei lisati di membrana delle cellule GH4C1, in condizioni basali, ha confermato i risultati dell'mRNA, mostrando un'espressione costitutiva di SST₁, SST₂ e SST₅ nelle cellule GH4C1, in particolare un'espressione di SST₂ 1.5 volte superiore a quella di SST₁ e SST₅ (Figura 11, pannello B).

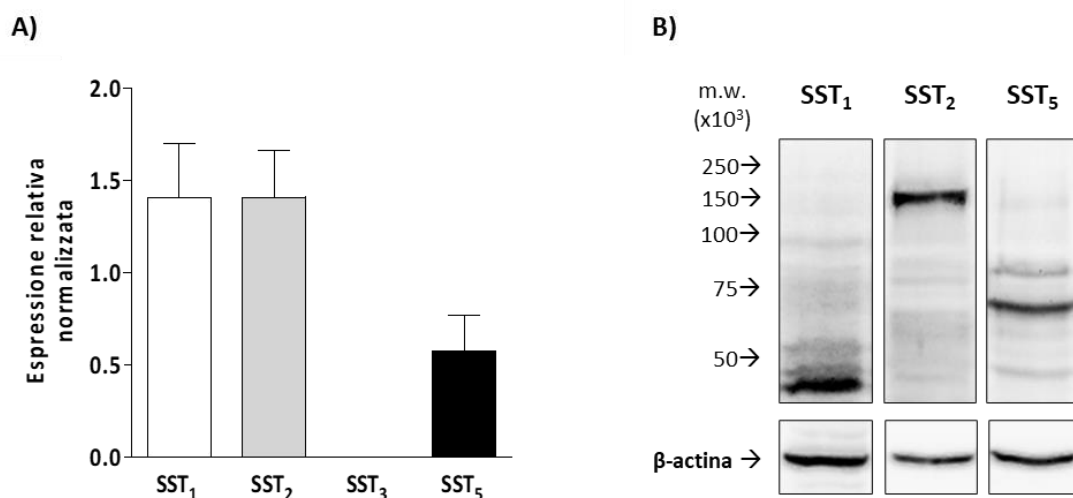


Figura 11. Espressione dell'mRNA e proteica dei SST nelle cellule GH4C1. (A) Espressione dell'mRNA dei SST. L'espressione genica dei SST è stata normalizzata su quella dei geni housekeeping GAPDH e 28S. (B) Espressione proteica dei SST. Immunoblot rappresentativo che mostra la presenza di bande molecolari pari a circa 45K, 150K e 75K corrispondenti a SST₁, SST₂ e SST₅, rispettivamente. [m.w., peso molecolare].

4.4. Effetto inibitorio degli SRL sulla proliferazione cellulare, sui livelli di cAMP e di Ca^{2+} nelle cellule GH4C1

Nelle cellule GH4C1, abbiamo osservato un effetto antiproliferativo statisticamente significativo di OCT, PAS e OCT+PAS (10^{-8} M) rispetto alle cellule non trattate (CTR: $100\% \pm 2.0$, OCT: $72.9\% \pm 5.8$, PAS: $77.1\% \pm 3.2$, OCT+PAS: $71.5\% \pm 4.6$; $p < 0.001$ vs. CTR). Inoltre, tutti i trattamenti hanno mostrato un'efficacia sovrapponibile (Figura 12, pannello A). È importante notare che la combinazione OCT+PAS non solo non ha indotto un effetto additivo/sinergico sulla proliferazione cellulare delle GH4C1, ma in accordo con l'indice di combinazione calcolato per l'effetto massimo ottenuto (CI = 1.79; dose-risposta da 10^{-10} a 10^{-7} M), l'interazione tra i due farmaci è risultata essere moderatamente antagonista (Figura 12, pannello B).

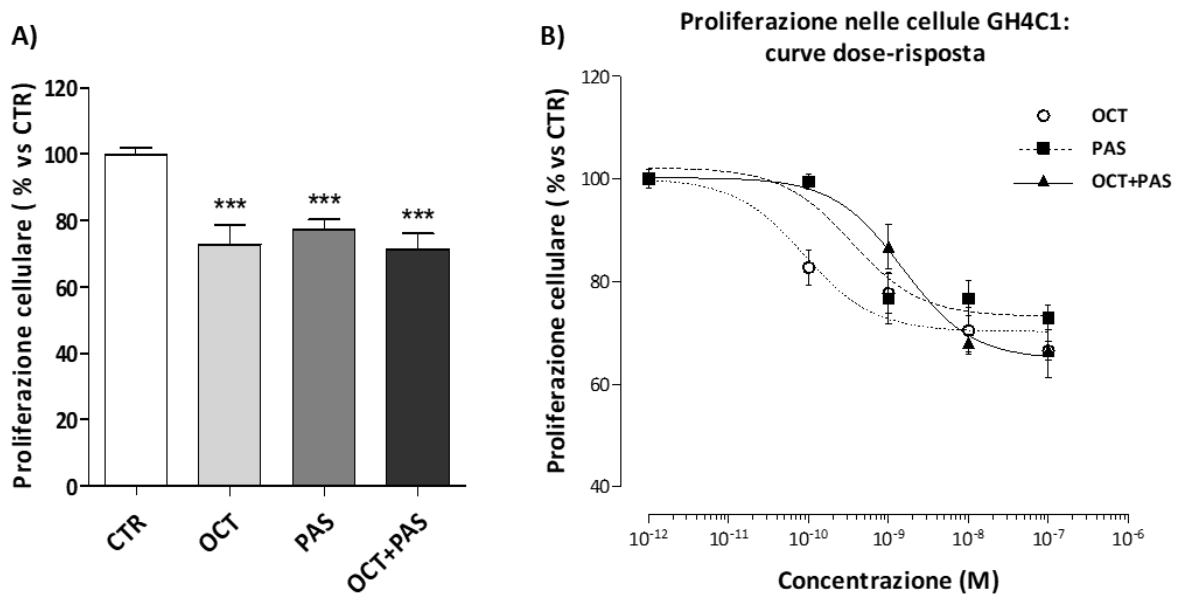


Figura 12. Effetto di OCT (10^{-8} M) e PAS (10^{-8} M), da soli o in combinazione equimolare, sulla proliferazione cellulare nelle cellule GH4C1. Pannello A) Effetto antiproliferativo degli SRL nella linea cellulare GH4C1. I dati sono espressi come media \pm SEM di quattro diversi esperimenti, eseguiti in triplicato, e riportati come percentuale di inibizione rispetto al controllo. Pannello B) Curve dose-risposta sulla proliferazione delle cellule

GH4C1 dopo 48 h di trattamento con OCT, PAS e la loro combinazione (intervallo di concentrazione 10^{-10}M – 10^{-7}M). [CTR, controllo; OCT, octreotide; PAS, pasireotide; *** $p < 0.001$ vs. controllo].

Per valutare i pathway intracellulari attivati da OCT, PAS e dalla loro combinazione, abbiamo valutato gli effetti dei trattamenti sull'accumulo di cAMP e sui livelli intracellulari di Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

In dettaglio, entrambi i composti, OCT e PAS (10^{-8}M) hanno indotto un'inibizione significativa dei livelli intracellulari di cAMP in cellule GH4C1 trattate con IBMX (CTR: $100.0\% \pm 2.5$, OCT: $46.0\% \pm 5.2$, PAS: $57.6\% \pm 18.8$; $p < 0.05$ vs. CTR). La combinazione di OCT+PAS (alla concentrazione equimolare 10^{-8}M) è stata in grado di ridurre significativamente l'accumulo di cAMP rispetto alle cellule non trattate, con un'efficacia simile a quella osservata per i due singoli farmaci (OCT+PAS: $38.6\% \pm 5.8$; $p < 0.01$ vs. CTR) (Figura 13, pannello A).

L'analisi della variazione di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cellule GH4C1 perfuse con KCl, dopo 5 minuti di pretrattamento con OCT e PAS (concentrazione 10^{-8}M), ha dimostrato che i due composti sono stati in grado di ridurre il flusso di Ca^{2+} dipendente dalla depolarizzazione (rispetto alle cellule non trattate), quando testati sia singolarmente che in combinazione (CTR: $100.0\% \pm 14.1$, OCT: $42.9\% \pm 14.0$, PAS: $49.1\% \pm 6.8$, OCT+PAS: $48.0\% \pm 19.3$; $p < 0.01$ vs. CTR). Inoltre, l'efficacia di OCT e PAS, nel ridurre i livelli intracellulari di Ca^{2+} , è risultata sovrapponibile e la combinazione dei due composti è risultata simile a quella dei singoli trattamenti (Figura 13, pannello B).

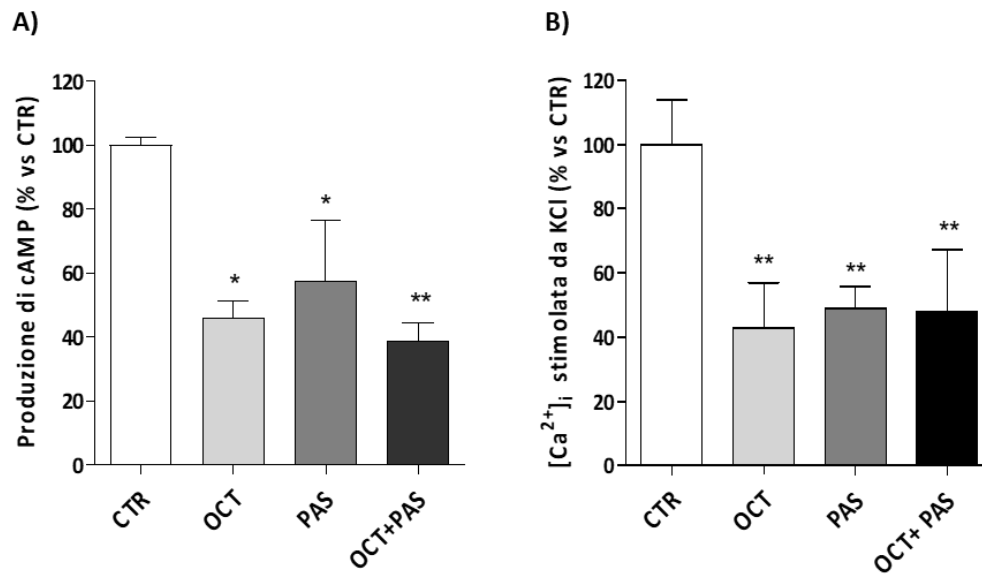


Figura 13. Effetto di OCT (10^{-8} M) e PAS (10^{-8} M), da soli o in combinazione equimolare, sui livelli intracellulari di cAMP e di $[Ca^{2+}]_i$ nelle cellule GH4C1. Pannello A) Effetto inibitorio di OCT, PAS e OCT+PAS sui livelli di cAMP nelle cellule GH4C1 trattate con IBMX. I dati sono espressi come percentuale di inibizione rispetto alle cellule non trattate \pm SEM di tre diversi esperimenti condotti in triplicato. Pannello B) Istogrammi che rappresentano la riduzione di $[Ca^{2+}]_i$ indotta dagli SRL in cellule stimulate con KCl, espressa come media (%) \pm SEM di 5 esperimenti indipendenti. [CTR, controllo; OCT, octreotide; PAS, pasireotide; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. controllo].

4.5. Effetto del BIM-23627 sull'inibizione della proliferazione cellulare e sulla produzione di cAMP indotta dagli SRL nelle cellule GH4C1

Per studiare meglio il ruolo di SST₂ nel mediare gli effetti di OCT e PAS, abbiamo utilizzato l'antagonista selettivo per SST₂, il BIM-23627, da solo o in combinazione con entrambi i composti.

Come atteso, il BIM-23627 (10⁻⁸M), da solo, non ha avuto alcun effetto sulla proliferazione cellulare delle GH4C1, mentre è stato in grado di contrastare significativamente l'inibizione della proliferazione cellulare indotta da OCT, quando testato in combinazione equimolare (OCT+BIM: 88.7% ± 5.6 vs. CTR, OCT: 72.9% ± 5.8 vs. CTR; OCT+BIM vs. OCT p<0.01) (Figura 14, pannello A). Allo stesso modo, la combinazione equimolare PAS+BIM-23627 ha portato ad una significativa riduzione dell'effetto antiproliferativo indotto dal trattamento singolo con PAS (PAS+BIM: 90.1% ± 5.7 vs. CTR, PAS: 77.1% ± 3.2 vs. CTR; PAS+BIM vs. PAS p<0.05) (Figura 14, pannello A).

Inoltre, il BIM-23627 da solo (concentrazione 10⁻⁸M) non ha modificato i livelli intracellulari di cAMP nelle cellule trattate con IBMX (BIM: 97.3% ± 11.3 vs. CTR). Tuttavia, quando testato in concentrazione equimolare (10⁻⁸M), il BIM-23627 ha ridotto significativamente l'effetto inibitorio sulla produzione di cAMP indotto sia da OCT (OCT+BIM: 85.6% ± 12.2 vs. CTR, OCT: 37.9% ± 3.7 vs. CTR; OCT+BIM vs. OCT p<0.001) che da PAS (PAS+BIM: 97.6% ± 3.1 vs. CTR, PAS: 40.3% ± 6.4 vs. CTR; PAS+BIM vs. PAS p<0.001) (Figura 14, pannello B).

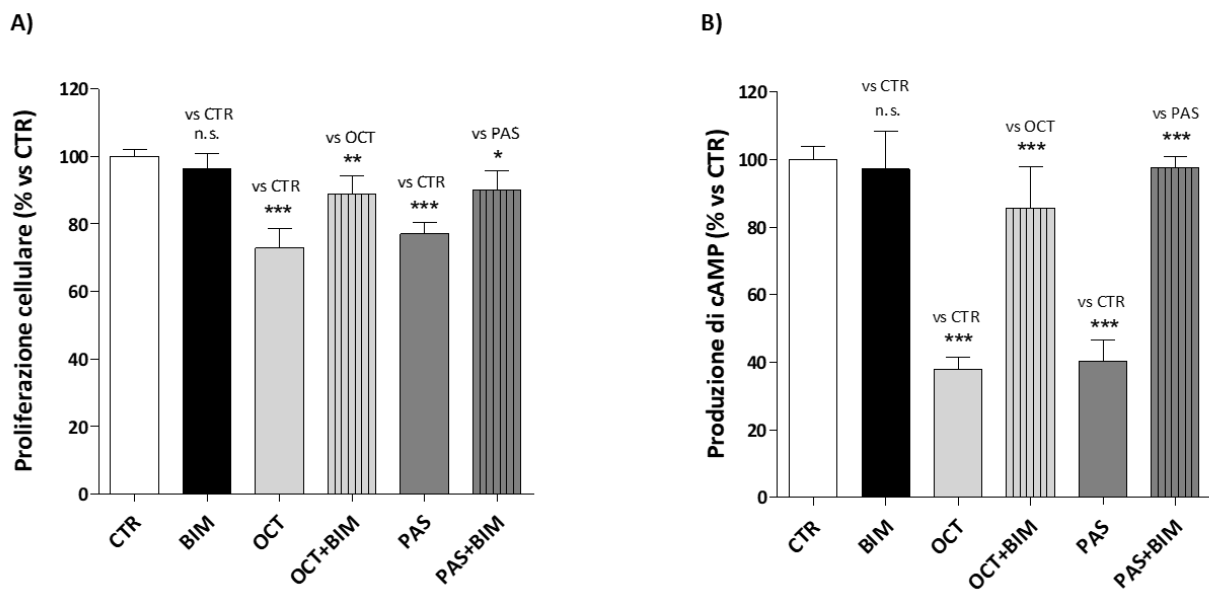


Figura 14. Effetto dell'antagonista selettivo per SST₂ (BIM-23627) sulla proliferazione cellulare e sulla produzione di cAMP indotta dagli SRL nelle cellule GH4C1. Effetto di OCT (10⁻⁸M), PAS (10⁻⁸M) e BIM-23627 (10⁻⁸M), da soli o in combinazione, sulla proliferazione cellulare delle GH4C1 (A) e sui livelli intracellulari di cAMP (B). I dati sono espressi come percentuale di inibizione rispetto alle cellule non trattate, riportata come media ± SEM di quattro (A) e tre esperimenti diversi (B) eseguiti in triplicato. [CTR, controllo; OCT, octreotide; PAS, pasireotide; BIM, antagonista selettivo per SST₂; n.s., statisticamente non significativo; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. controllo].

4.6. Internalizzazione di SST₂ e SST₅ indotta da OCT e PAS nelle cellule GH4C1

Per spiegare ancora più dettagliatamente i meccanismi biologici mediati dagli effetti di OCT e PAS nel nostro modello cellulare, abbiamo valutato l'internalizzazione di SST₂ e SST₅ dopo trattamento delle cellule con i due SRL (10⁻⁷M, 20 minuti di incubazione) mediante immunocitofluorescenza. Prima dell'esposizione al farmaco, le cellule GH4C1 sono state colorate con il cromoforo fluorescente lipofilico Vybrant™ DiI che colora il bilayer lipidico della membrana cellulare in arancione-rosso. I risultati dell'immunocitofluorescenza nelle cellule non trattate hanno evidenziato un elevato segnale giallo fluorescente sulla membrana cellulare dovuto alla co-localizzazione tra i SST₂ e SST₅ (fluorescenza verde) e la membrana cellulare (fluorescenza rossa), come atteso per i recettori GPCR non attivati (Figura 15, pannelli A e D). Dopo pochi minuti dal trattamento sia con OCT che con PAS, la colorazione per SST₂ (verde) è risultata principalmente intracitoplasmatica, suggerendo che entrambi i composti sono stati in grado di attivare ed internalizzare in maniera consistente questo sottotipo recettoriale nelle cellule GH4C1 (Figura 15, pannelli B e C). Al contrario, dopo 20 minuti di trattamento, SST₅ risultava essere espresso principalmente sulla membrana cellulare, suggerendo o un'internalizzazione e un recycling veloci, o una mancata attivazione di SST₅ a seguito del legame con OCT e PAS (Figura 15, pannelli E ed F).

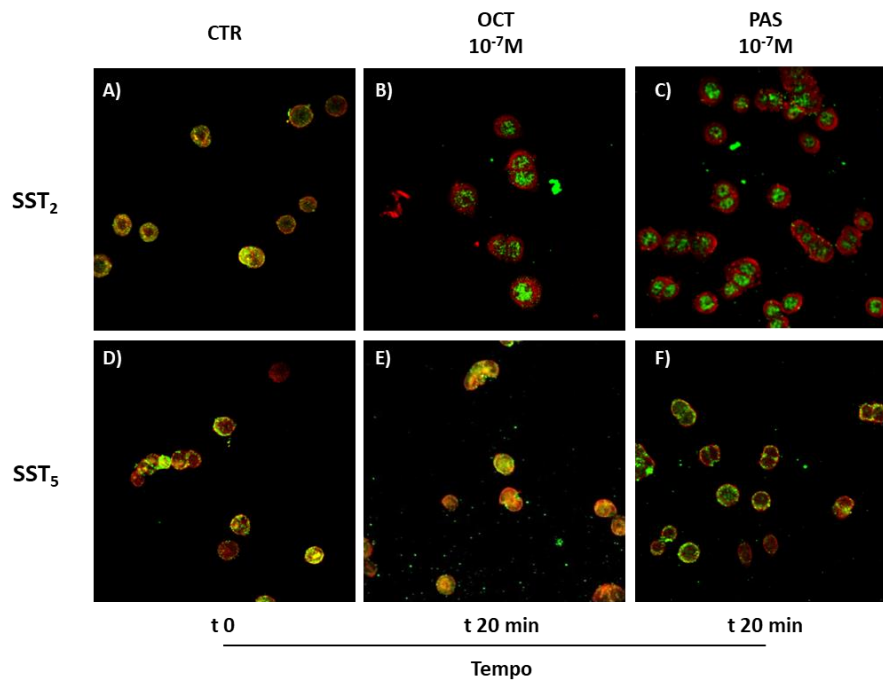


Figura 15. Effetto del trattamento con OCT e PAS ($10^{-7}M$ per 20 minuti) sull'internalizzazione di SST₂ e SST₅ nelle cellule GH4C1. Fluorescenza rossa, membrana cellulare colorata con DiI; fluorescenza verde, SST. [CTR, controllo; OCT, octreotide; PAS, pasireotide].

5. DISCUSSIONE

Nel nostro studio abbiamo descritto per la prima volta gli effetti del trattamento combinato con OCT e PAS sulla secrezione di GH in colture primarie umane somatotrope. Abbiamo osservato che, in campioni tumorali ottenuti da pazienti acromegalici, l'attività inibitoria di OCT, PAS e OCT+PAS era sovrapponibile.

È interessante notare che l'effetto antisecretivo dei due composti (testati da soli o in combinazione) è risultato correlare significativamente e direttamente con l'espressione di SST₂ (ma non di SST₅), valutata mediante immunohistochimica su tessuto paraffinato.

Precedenti studi *in vitro* avevano già dimostrato che SST₂ rappresenta il bersaglio principale dell'inibizione della secrezione ormonale indotta da PAS nelle cellule tumorali somatotrope [55,62,63,79]. A questo proposito, Hofland e colleghi hanno descritto una correlazione diretta e significativa tra l'espressione dell'mRNA di SST₂ e l'attività antisecretiva sia di OCT che di PAS [55]. In linea con questi risultati, più recentemente il nostro gruppo ha confermato che l'espressione dell'mRNA di SST₂ correlava significativamente con l'efficacia di OCT nel ridurre la secrezione di GH *in vitro*, osservando un andamento simile anche per PAS [63]. Inoltre, nello stesso studio il nostro gruppo ha osservato che la percentuale di riduzione del GH indotta dal trattamento delle differenti colture cellulari con OCT risultava essere fortemente e direttamente correlata a quella indotta da PAS ($r=0.829$, $p<0.0001$) [63]. È interessante osservare che quest'ultimo risultato è stato confermato anche in questo lavoro ($r=0.85$, $p=0.001$).

Come menzionato in precedenza, nel presente studio abbiamo trovato una correlazione significativa tra l'effetto antisecretivo di OCT e di PAS e l'espressione proteica di SST₂ nel tessuto tumorale. Poiché i ligandi testati interagiscono direttamente con i recettori espressi sulla membrana

cellulare, questi risultati ottenuti a livello proteico rafforzano le osservazioni precedenti basate sull'espressione recettoriale a livello di mRNA.

Il risultato più rilevante del nostro studio, però, è rappresentato dalla mancanza di effetto additivo o sinergico della combinazione OCT+PAS nell'inibizione della secrezione di GH *in vitro* in cellule tumorali somatotrope umane.

Inizialmente alcuni studi preclinici avevano dimostrato che la combinazione di agonisti con affinità preferenziale per SST₂ e SST₅ poteva agire sinergicamente nell'inibire la secrezione di GH sia in cellule ipofisarie fetali umane stimolate con GHRH che in cellule ipofisarie somatomammotrope [54,80]. Quindi, sulla base dell'elevata affinità di legame di PAS per SST₅ (nell'ordine della concentrazione nanomolare) [43], e del ruolo di SST₅ nel mediare gli effetti biologici di PAS, ben descritti in altri tumori ipofisari (come i tumori corticotropi) [81], il trattamento combinato con OCT e PAS nei tumori somatotropi sembrava poter apportare vantaggi rispetto al trattamento medico di prima linea con OCT in monoterapia e quindi essere meritevole di ulteriori approfondimenti.

A questo proposito, i nostri risultati suggeriscono che l'effetto antisecretivo di OCT e di PAS *in vitro* sia mediato dall'attivazione dello stesso recettore di membrana (SST₂), non supportando l'idea di eventuali studi clinici volti a valutare l'effetto del trattamento combinato con SRL di prima e seconda generazione nell'acromegalia. In ogni caso, utilizzando il nostro modello sperimentale su colture cellulari *in vitro*, non è stato possibile chiarire con certezza se i pazienti potrebbero beneficiare del trattamento combinato OCT+PAS, valutato in termini di riduzione dei livelli plasmatici di IGF-1 o di miglioramento degli effetti sul metabolismo glucidico indotti da PAS (come ipotizzato da altri autori) [82,83].

Poiché le colture primarie di cellule somatotrope umane hanno generalmente un basso indice di proliferazione *in vitro* [84] e quindi non sono idonee per test di proliferazione, per valutare l'effetto additivo e/o sinergico della combinazione OCT+PAS sulla crescita tumorale, abbiamo utilizzato un

modello ben consolidato di tumore somatotropo murino, le cellule GH4C1. Analogamente all'effetto del trattamento combinato sulla secrezione di GH nelle colture primarie, anche i test di proliferazione sulle GH4C1 non hanno mostrato alcun effetto additivo e/o sinergico della combinazione OCT+PAS, così come nessun effetto additivo/sinergico sulla modulazione dei principali meccanismi intracellulari coinvolti a valle dell'attivazione dei SST (produzione di cAMP e i livelli di $[Ca^{2+}]_i$). In dettaglio, abbiamo osservato che OCT e PAS sono stati in grado di ridurre la proliferazione delle cellule GH4C1 in maniera pressoché sovrapponibile (circa -25% vs. controllo), in linea con dati precedenti [85-87]. È interessante notare che la loro combinazione non ha mostrato un effetto superiore rispetto al trattamento con i singoli composti, suggerendo, ancora una volta, che gli effetti di entrambi i farmaci sulla proliferazione cellulare siano mediati dallo stesso meccanismo biologico. A supporto del ruolo di SST₂ come bersaglio principale di entrambi i farmaci, anche l'indice di combinazione degli effetti di OCT e PAS ha mostrato un antagonismo moderato tra i due farmaci. Infatti, poiché anche studi precedenti identificavano il PAS come un agonista parziale per SST₂, è quindi plausibile che, testato in combinazione con OCT, PAS possa contrastarne lievemente gli effetti [45].

Per studiare ulteriormente il ruolo di SST₂ nel mediare la risposta di entrambi i farmaci nelle cellule GH4C1, abbiamo utilizzato un antagonista selettivo di SST₂ (BIM-23627), già validato in studi preclinici precedenti [48,88-90], da solo o in associazione con OCT e PAS. L'evidenza che il BIM-23627 sia stato in grado di contrastare l'attività antiproliferativa indotta sia da OCT che da PAS ha sottolineato, ancora una volta, il ruolo principale di SST₂ nel mediare l'effetto non solo di OCT, come atteso, ma anche di PAS.

In linea con i dati sulla proliferazione cellulare, anche la valutazione di due fenomeni coinvolti a valle dell'attivazione dei SST da parte degli SRL, quali la riduzione di cAMP e di $[Ca^{2+}]_i$, non ha mostrato alcun effetto additivo/sinergico del trattamento combinato OCT+PAS rispetto al

trattamento con i singoli composti. Inoltre, poiché l'antagonista selettivo per SST₂ in associazione ad OCT e PAS è stato in grado di contrastare l'effetto inibitorio dei due SRL anche sui livelli di cAMP, i nostri dati sono stati in grado, non solo di descrivere un effetto funzionale (antiproliferativo) indotto da OCT, PAS e dalla loro combinazione, ma anche di specificare un meccanismo intracellulare successivo all'attivazione di SST₂.

Questi ultimi risultati rafforzano anche le nostre osservazioni sull'effetto di OCT, PAS e della loro combinazione sulla secrezione di GH nelle colture primarie di tumore somatotropo testate. Infatti, la via di trasduzione del segnale intracellulare, che coinvolge il cAMP e la regolazione della conduttanza ionica per prevenire l'aumento di $[Ca^{2+}]_i$, è un meccanismo biologico fondamentale coinvolto anche nell'attività antisecretiva esercitata dagli SRL nei tumori somatotropi [10,15,91].

Complessivamente, l'efficacia sovrapponibile mostrata da OCT e da PAS sia sulla secrezione di GH nelle colture primarie che sulla proliferazione della linea cellulare GH4C1, la mancanza dell'effetto additivo o sinergico osservata con il trattamento combinato, così come l'antagonismo completo mostrato dal BIM-23627 verso entrambi i composti, rappresentano risultati che, considerati nel loro insieme, propendono a favore del ruolo predominante di SST₂ nel mediare le attività biologiche dei due SRL nei modelli testati.

Infine, allo scopo di evidenziare un potenziale ruolo specifico di OCT e PAS nella modulazione delle dinamiche di internalizzazione dei SST, abbiamo studiato il *trafficking* di SST₂ e SST₅ nelle cellule GH4C1. A questo proposito, studi precedenti condotti su modelli cellulari transfettati con i SST (come le cellule HEK 230 e CHO-K1) oppure su cellule non ipofisarie che esprimono SST endogeni (come la linea cellulare AR42J) hanno dimostrato che il PAS induceva un'internalizzazione di SST₂ più bassa sia rispetto ad OCT che alla SRIF endogena [46-48,92]. In particolare, poiché l'internalizzazione recettoriale è mediata dalla fosforilazione di residui di serine e treonine all'estremità C-terminale, uno studio di Poll e colleghi sulle cellule murine ipofisarie GH3

(una linea cellulare dalla quale derivano le cellule GH4C1) ha evidenziato una riduzione della fosforilazione di SST₂ a seguito di trattamento con PAS, rispetto ad OCT e alla SRIF [48]. Contrariamente allo studio di Poll e agli studi condotti su linee cellulari transfettate, che mostrano una ridotta internalizzazione di SST₂ a seguito di trattamento con PAS, nel nostro studio abbiamo dimostrato che i trattamenti con OCT e PAS determinano, entrambi, una robusta internalizzazione di SST₂ nelle cellule GH4C1, nonostante l'utilizzo delle stesse condizioni sperimentali usate dagli altri studi (analoga concentrazione di farmaco e simile tempistica di trattamento) [46,47]. Tuttavia, i nostri risultati sono in linea con i risultati degli studi funzionali che hanno mostrato un'efficacia simile di OCT e di PAS nelle cellule GH4C1, supportando così la forte attivazione di SST₂ esercitata da entrambi i composti in questo specifico modello cellulare.

Questa nostra analisi mette in evidenza che, quando si valutano la fosforilazione, il trafficking e le vie di trasduzione del segnale intracellulare dei SST, si possono presentare differenze significative in diversi tipi di cellule, come già sottolineato da altri autori [62,93,94]. Inoltre, altri studi hanno enfatizzato le caratteristiche specie-specifiche dei SST, tra cui il diverso pattern di fosforilazione di SST₂ indotto dal ligando nel ratto rispetto a quello indotto sul medesimo recettore nell'uomo [7,92]. Quindi, questa limitazione deve essere tenuta in considerazione, sebbene i nostri risultati sulle cellule GH4C1 siano coerenti con le osservazioni ottenute sulle colture primarie umane di tumore somatotropo. Purtroppo, ad oggi non sono disponibili linee cellulari immortalizzate che derivino da tumori somatotropi umani da poter utilizzare negli studi preclinici.

6. CONCLUSIONI

Nelle colture primarie di tumori somatotropi, il trattamento combinato OCT+PAS è risultato sovrapponibile ai singoli trattamenti nel ridurre la secrezione di GH. In accordo con questi dati, abbiamo osservato gli stessi risultati valutando la proliferazione cellulare, l'accumulo di cAMP e la modulazione di $[Ca^{2+}]_i$ nelle cellule GH4C1.

Nelle colture primarie umane l'effetto antisecretivo di OCT e PAS correlava significativamente con l'espressione di SST₂ sui tessuti tumorali paraffinati; mentre nelle cellule GH4C1 l'antagonista selettivo per SST₂, testato in combinazione con OCT e PAS, è stato in grado di contrastare quasi completamente gli effetti di entrambi gli SRL.

Tutte queste evidenze suggeriscono come, nel nostro scenario sperimentale, OCT e PAS sembrano agire prevalentemente attraverso SST₂, deponendo così a sfavore di una eventuale utilità di un trattamento combinato OCT+PAS, almeno per quanto riguarda l'acromegalia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Davis, S.W.; Ellsworth, B.S.; Perez Millan, M.I.; Gergics, P.; Schade, V.; Foyouzi, N.; Brinkmeier, M.L.; Mortensen, A.H.; Camper, S.A. Pituitary gland development and disease: from stem cell to hormone production. *Curr Top Dev Biol* **2013**, *106*, 1-47, doi:10.1016/B978-0-12-416021-7.00001-8.
2. Yeung, C.M.; Chan, C.B.; Leung, P.S.; Cheng, C.H. Cells of the anterior pituitary. *Int J Biochem Cell Biol* **2006**, *38*, 1441-1449, doi:10.1016/j.biocel.2006.02.012.
3. Rosso, L.; Mienville, J.M. Pituitary modulation of neurohormone output. *Glia* **2009**, *57*, 235-243, doi:10.1002/glia.20760.
4. Perez-Castro, C.; Renner, U.; Haedo, M.R.; Stalla, G.K.; Arzt, E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiol Rev* **2012**, *92*, 1-38, doi:10.1152/physrev.00003.2011.
5. Melmed, S. Medical progress: Acromegaly. *N Engl J Med* **2006**, *355*, 2558-2573, doi:10.1056/NEJMra062453.
6. Reichlin, S. Somatostatin. *N Engl J Med* **1983**, *309*, 1495-1501, doi:10.1056/NEJM198312153092406.
7. Gunther, T.; Tulipano, G.; Dournaud, P.; Bousquet, C.; Csaba, Z.; Kreienkamp, H.J.; Lupp, A.; Korbonits, M.; Castano, J.P.; Wester, H.J., et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacol Rev* **2018**, *70*, 763-835, doi:10.1124/pr.117.015388.
8. Patel, Y.C. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* **1999**, *20*, 157-198, doi:10.1006/frne.1999.0183.
9. Florio, T. Molecular mechanisms of the antiproliferative activity of somatostatin receptors (SSTRs) in neuroendocrine tumors. *Front Biosci* **2008**, *13*, 822-840.
10. Ben-Shlomo, A.; Melmed, S. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab* **2010**, *21*, 123-133, doi:10.1016/j.tem.2009.12.003.
11. Duran-Prado, M.; Gahete, M.D.; Martinez-Fuentes, A.J.; Luque, R.M.; Quintero, A.; Webb, S.M.; Benito-Lopez, P.; Leal, A.; Schulz, S.; Gracia-Navarro, F., et al. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **2009**, *94*, 2634-2643, doi:10.1210/jc.2008-2564.
12. Ferone, D.; Gatto, F.; Arvigo, M.; Resmini, E.; Boschetti, M.; Teti, C.; Esposito, D.; Minuto, F. The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol* **2009**, *42*, 361-370, doi:10.1677/JME-08-0162.
13. Venkatakrishnan, A.J.; Deupi, X.; Lebon, G.; Tate, C.G.; Schertler, G.F.; Babu, M.M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2013**, *494*, 185-194, doi:10.1038/nature11896.
14. Law, S.F.; Woulfe, D.; Reisine, T. Somatostatin receptor activation of cellular effector systems. *Cell Signal* **1995**, *7*, 1-8, doi:10.1016/0898-6568(94)00064-i.
15. Gatto, F.; Barbieri, F.; Arvigo, M.; Thellung, S.; Amaru, J.; Albertelli, M.; Ferone, D.; Florio, T. Biological and Biochemical Basis of the Differential Efficacy of First and Second Generation Somatostatin Receptor Ligands in Neuroendocrine Neoplasms. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20163940.

16. Schettini, G.; Florio, T.; Meucci, O.; Landolfi, E.; Lombardi, G.; Marino, A. Somatostatin inhibition of anterior pituitary adenylate cyclase activity: different sensitivity between male and female rats. *Brain Res* **1988**, *439*, 322-329, doi:10.1016/0006-8993(88)91489-8.
17. Patel, Y.C.; Greenwood, M.T.; Warszynska, A.; Panetta, R.; Srikant, C.B. All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, *198*, 605-612, doi:10.1006/bbrc.1994.1088.
18. Florio, T. Somatostatin/somatostatin receptor signalling: phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Endocrinol* **2008**, *286*, 40-48, doi:10.1016/j.mce.2007.08.012.
19. Florio, T.; Thellung, S.; Arena, S.; Corsaro, A.; Bajetto, A.; Schettini, G.; Stork, P.J. Somatostatin receptor 1 (SSTR1)-mediated inhibition of cell proliferation correlates with the activation of the MAP kinase cascade: role of the phosphotyrosine phosphatase SHP-2. *J Physiol Paris* **2000**, *94*, 239-250.
20. Florio, T.; Yao, H.; Carey, K.D.; Dillon, T.J.; Stork, P.J. Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol* **1999**, *13*, 24-37, doi:10.1210/mend.13.1.0224.
21. Pages, P.; Benali, N.; Saint-Laurent, N.; Esteve, J.P.; Schally, A.V.; Tkaczuk, J.; Vaysse, N.; Susini, C.; Buscail, L. sst2 somatostatin receptor mediates cell cycle arrest and induction of p27(Kip1). Evidence for the role of SHP-1. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 15186-15193, doi:10.1074/jbc.274.21.15186.
22. Ruscica, M.; Magni, P.; Steffani, L.; Gatto, F.; Albertelli, M.; Rametta, R.; Valenti, L.; Ameri, P.; Magnaghi, V.; Culler, M.D., et al. Characterization and sub-cellular localization of SS1R, SS2R, and SS5R in human late-stage prostate cancer cells: effect of mono- and bi-specific somatostatin analogs on cell growth. *Mol Cell Endocrinol* **2014**, *382*, 860-870, doi:10.1016/j.mce.2013.10.027.
23. Theodoropoulou, M.; Zhang, J.; Laupheimer, S.; Paez-Pereda, M.; Erneux, C.; Florio, T.; Pagotto, U.; Stalla, G.K. Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing Zac1 expression. *Cancer Res* **2006**, *66*, 1576-1582, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1189.
24. Gatto, F.; Feelders, R.; van der Pas, R.; Kros, J.M.; Dogan, F.; van Koetsveld, P.M.; van der Lelij, A.J.; Neggers, S.J.; Minuto, F.; de Herder, W., et al. beta-Arrestin 1 and 2 and G protein-coupled receptor kinase 2 expression in pituitary adenomas: role in the regulation of response to somatostatin analogue treatment in patients with acromegaly. *Endocrinology* **2013**, *154*, 4715-4725, doi:10.1210/en.2013-1672.
25. Krupnick, J.G.; Benovic, J.L. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1998**, *38*, 289-319, doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.289.
26. Gatto, F.; Hofland, L.J. The role of somatostatin and dopamine D2 receptors in endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* **2011**, *18*, R233-251, doi:10.1530/ERC-10-0334.
27. Melmed, S. Pituitary-Tumor Endocrinopathies. *N Engl J Med* **2020**, *382*, 937-950, doi:10.1056/NEJMra1810772.
28. Trouillas, J.; Jaffrain-Rea, M.L.; Vasiljevic, A.; Raverot, G.; Roncaroli, F.; Villa, C. How to Classify the Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12020514.
29. Mete, O.; Lopes, M.B. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol* **2017**, *28*, 228-243, doi:10.1007/s12022-017-9498-z.
30. Trouillas, J.; Roy, P.; Sturm, N.; Dantony, E.; Cortet-Rudelli, C.; Viennet, G.; Bonneville, J.F.; Assaker, R.; Auger, C.; Brue, T., et al. A new prognostic clinicopathological classification of

- pituitary adenomas: a multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol* **2013**, *126*, 123-135, doi:10.1007/s00401-013-1084-y.
31. Asa, S.L.; Ezzat, S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* **1998**, *19*, 798-827, doi:10.1210/edrv.19.6.0350.
 32. Miller, G.M.; Alexander, J.M.; Bikkal, H.A.; Katznelson, L.; Zervas, N.T.; Klibanski, A. Somatostatin receptor subtype gene expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **1995**, *80*, 1386-1392, doi:10.1210/jcem.80.4.7714115.
 33. Panetta, R.; Patel, Y.C. Expression of mRNA for all five human somatostatin receptors (hSSTR1-5) in pituitary tumors. *Life Sci* **1995**, *56*, 333-342, doi:10.1016/0024-3205(94)00956-2.
 34. Greenman, Y.; Melmed, S. Expression of three somatostatin receptor subtypes in pituitary adenomas: evidence for preferential SSTR5 expression in the mammosomatotroph lineage. *J Clin Endocrinol Metab* **1994**, *79*, 724-729, doi:10.1210/jcem.79.3.7521350.
 35. Greenman, Y.; Melmed, S. Heterogeneous expression of two somatostatin receptor subtypes in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **1994**, *78*, 398-403, doi:10.1210/jcem.78.2.8106629.
 36. Brazeau, P.; Vale, W.; Burgus, R.; Ling, N.; Butcher, M.; Rivier, J.; Guillemin, R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* **1973**, *179*, 77-79, doi:10.1126/science.179.4068.77.
 37. Bauer, W.; Briner, U.; Doepfner, W.; Haller, R.; Huguenin, R.; Marbach, P.; Petcher, T.J.; Pless, S.M.S 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* **1982**, *31*, 1133-1140.
 38. Kuhn, J.M.; Basin, C.; Mollard, M.; de Rouge, B.; Baudoin, C.; Obach, R.; Tolis, G. Pharmacokinetic study and effects on growth hormone secretion in healthy volunteers of the new somatostatin analogue BIM 23014. *Eur J Clin Pharmacol* **1993**, *45*, 73-77.
 39. Barbieri, F.; Bajetto, A.; Pattarozzi, A.; Gatti, M.; Wurth, R.; Thellung, S.; Corsaro, A.; Villa, V.; Nizzari, M.; Florio, T. Peptide receptor targeting in cancer: the somatostatin paradigm. *Int J Pept* **2013**, *2013*, 926295, doi:10.1155/2013/926295.
 40. Theodoropoulou, M.; Stalla, G.K. Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol* **2013**, *34*, 228-252, doi:10.1016/j.yfrne.2013.07.005.
 41. Ruscica, M.; Arvigo, M.; Steffani, L.; Ferone, D.; Magni, P. Somatostatin, somatostatin analogs and somatostatin receptor dynamics in the biology of cancer progression. *Curr Mol Med* **2013**, *13*, 555-571.
 42. Strosberg, J.; Kvols, L. Antiproliferative effect of somatostatin analogs in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World J Gastroenterol* **2010**, *16*, 2963-2970, doi:10.3748/wjg.v16.i24.2963.
 43. Bruns, C.; Lewis, I.; Briner, U.; Meno-Tetang, G.; Weckbecker, G. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol* **2002**, *146*, 707-716.
 44. Feelders, R.A.; Yasothan, U.; Kirkpatrick, P. Pasireotide. *Nat Rev Drug Discov* **2012**, *11*, 597-598, doi:10.1038/nrd3788.
 45. Cescato, R.; Loesch, K.A.; Waser, B.; Macke, H.R.; Rivier, J.E.; Reubi, J.C.; Schonbrunn, A. Agonist-biased signaling at the sst2A receptor: the multi-somatostatin analogs KE108 and SOM230 activate and antagonize distinct signaling pathways. *Mol Endocrinol* **2010**, *24*, 240-249, doi:10.1210/me.2009-0321.
 46. Lesche, S.; Lehmann, D.; Nagel, F.; Schmid, H.A.; Schulz, S. Differential effects of octreotide and pasireotide on somatostatin receptor internalization and trafficking in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **2009**, *94*, 654-661, doi:10.1210/jc.2008-1919.

47. Kao, Y.J.; Ghosh, M.; Schonbrunn, A. Ligand-dependent mechanisms of sst2A receptor trafficking: role of site-specific phosphorylation and receptor activation in the actions of biased somatostatin agonists. *Mol Endocrinol* **2011**, *25*, 1040-1054, doi:10.1210/me.2010-0398.
48. Poll, F.; Lehmann, D.; Illing, S.; Ginj, M.; Jacobs, S.; Lupp, A.; Stumm, R.; Schulz, S. Pasireotide and octreotide stimulate distinct patterns of sst2A somatostatin receptor phosphorylation. *Mol Endocrinol* **2010**, *24*, 436-446, doi:10.1210/me.2009-0315.
49. Campana, C.; Cocchiara, F.; Corica, G.; Nista, F.; Arvigo, M.; Amaru, J.; Rossi, D.C.; Zona, G.; Ferone, D.; Gatto, F. Discordant GH and IGF-1 results in treated acromegaly: impact of GH cut-offs and mean values assessment. *J Clin Endocrinol Metab* **2020**, 10.1210/clinem/dgaa859, doi:10.1210/clinem/dgaa859.
50. Katznelson, L.; Laws, E.R., Jr.; Melmed, S.; Molitch, M.E.; Murad, M.H.; Utz, A.; Wass, J.A.; Endocrine, S. Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **2014**, *99*, 3933-3951, doi:10.1210/jc.2014-2700.
51. Giustina, A.; Chanson, P.; Kleinberg, D.; Bronstein, M.D.; Clemmons, D.R.; Klibanski, A.; van der Lely, A.J.; Strasburger, C.J.; Lamberts, S.W.; Ho, K.K., et al. Expert consensus document: A consensus on the medical treatment of acromegaly. *Nat Rev Endocrinol* **2014**, *10*, 243-248, doi:10.1038/nrendo.2014.21.
52. Corica, G.; Ceraudo, M.; Campana, C.; Nista, F.; Cocchiara, F.; Boschetti, M.; Zona, G.; Criminelli, D.; Ferone, D.; Gatto, F. Octreotide-Resistant Acromegaly: Challenges and Solutions. *Ther Clin Risk Manag* **2020**, *16*, 379-391, doi:10.2147/TCRM.S183360.
53. Ben-Shlomo, A.; Melmed, S. Somatostatin agonists for treatment of acromegaly. *Mol Cell Endocrinol* **2008**, *286*, 192-198, doi:10.1016/j.mce.2007.11.024.
54. Jaquet, P.; Saveanu, A.; Gunz, G.; Fina, F.; Zamora, A.J.; Grino, M.; Culler, M.D.; Moreau, J.P.; Enjalbert, A.; Ouafik, L.H. Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, *85*, 781-792, doi:10.1210/jcem.85.2.6338.
55. Hofland, L.J.; van der Hoek, J.; van Koetsveld, P.M.; de Herder, W.W.; Waaijers, M.; Sprij-Mooij, D.; Bruns, C.; Weckbecker, G.; Feelders, R.; van der Lely, A.J., et al. The novel somatostatin analog SOM230 is a potent inhibitor of hormone release by growth hormone- and prolactin-secreting pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **2004**, *89*, 1577-1585, doi:10.1210/jc.2003-031344.
56. Taboada, G.F.; Luque, R.M.; Neto, L.V.; Machado Ede, O.; Sbaffi, B.C.; Domingues, R.C.; Marcondes, J.B.; Chimelli, L.M.; Fontes, R.; Niemeyer, P., et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *Eur J Endocrinol* **2008**, *158*, 295-303, doi:10.1530/EJE-07-0562.
57. Plockinger, U.; Albrecht, S.; Mawrin, C.; Saeger, W.; Buchfelder, M.; Petersenn, S.; Schulz, S. Selective loss of somatostatin receptor 2 in octreotide-resistant growth hormone-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **2008**, *93*, 1203-1210, doi:10.1210/jc.2007-1986.
58. Gatto, F.; Feelders, R.A.; van der Pas, R.; Kros, J.M.; Waaijers, M.; Sprij-Mooij, D.; Neggers, S.J.; van der Lelij, A.J.; Minuto, F.; Lamberts, S.W., et al. Immunoreactivity score using an anti-sst2A receptor monoclonal antibody strongly predicts the biochemical response to adjuvant treatment with somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* **2013**, *98*, E66-71, doi:10.1210/jc.2012-2609.
59. Casar-Borota, O.; Heck, A.; Schulz, S.; Nesland, J.M.; Ramm-Pettersen, J.; Lekva, T.; Alafuzoff, I.; Bollerslev, J. Expression of SSTR2a, but not of SSTRs 1, 3, or 5 in somatotroph adenomas assessed by monoclonal antibodies was reduced by octreotide and correlated

- with the acute and long-term effects of octreotide. *J Clin Endocrinol Metab* **2013**, *98*, E1730-1739, doi:10.1210/jc.2013-2145.
60. Carmichael, J.D.; Bonert, V.S.; Nuno, M.; Ly, D.; Melmed, S. Acromegaly clinical trial methodology impact on reported biochemical efficacy rates of somatostatin receptor ligand treatments: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **2014**, *99*, 1825-1833, doi:10.1210/jc.2013-3757.
 61. Colao, A.; Bronstein, M.D.; Freda, P.; Gu, F.; Shen, C.C.; Gadelha, M.; Fleseriu, M.; van der Lely, A.J.; Farrall, A.J.; Hermosillo Resendiz, K., et al. Pasireotide versus octreotide in acromegaly: a head-to-head superiority study. *J Clin Endocrinol Metab* **2014**, *99*, 791-799, doi:10.1210/jc.2013-2480.
 62. Ibanez-Costa, A.; Rivero-Cortes, E.; Vazquez-Borrego, M.C.; Gahete, M.D.; Jimenez-Reina, L.; Venegas-Moreno, E.; de la Riva, A.; Arraez, M.A.; Gonzalez-Molero, I.; Schmid, H.A., et al. Octreotide and pasireotide (dis)similarly inhibit pituitary tumor cells in vitro. *J Endocrinol* **2016**, *231*, 135-145, doi:10.1530/JOE-16-0332.
 63. Gatto, F.; Feelders, R.A.; Franck, S.E.; van Koetsveld, P.M.; Dogan, F.; Kros, J.M.; Neggers, S.; van der Lely, A.J.; Lamberts, S.W.J.; Ferone, D., et al. In Vitro Head-to-Head Comparison Between Octreotide and Pasireotide in GH-Secreting Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **2017**, *102*, 2009-2018, doi:10.1210/jc.2017-00135.
 64. Muhammad, A.; Coopmans, E.C.; Gatto, F.; Franck, S.E.; Janssen, J.; van der Lely, A.J.; Hofland, L.J.; Neggers, S. Pasireotide Responsiveness in Acromegaly Is Mainly Driven by Somatostatin Receptor Subtype 2 Expression. *J Clin Endocrinol Metab* **2019**, *104*, 915-924, doi:10.1210/jc.2018-01524.
 65. Iacovazzo, D.; Carlsen, E.; Lugli, F.; Chiloiro, S.; Piacentini, S.; Bianchi, A.; Giampietro, A.; Mormando, M.; Clear, A.J.; Doglietto, F., et al. Factors predicting pasireotide responsiveness in somatotroph pituitary adenomas resistant to first-generation somatostatin analogues: an immunohistochemical study. *Eur J Endocrinol* **2016**, *174*, 241-250, doi:10.1530/EJE-15-0832.
 66. Chiloiro, S.; Bima, C.; Tartaglione, T.; Giampietro, A.; Gessi, M.; Lauretti, L.; Anile, C.; Colosimo, C.; Rindi, G.; Pontecorvi, A., et al. Pasireotide and Pegvisomant Combination Treatment in Acromegaly Resistant to Second-Line Therapies: A Longitudinal Study. *J Clin Endocrinol Metab* **2019**, *104*, 5478-5482, doi:10.1210/jc.2019-00825.
 67. Tashjian, A.H., Jr.; Yasumura, Y.; Levine, L.; Sato, G.H.; Parker, M.L. Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology* **1968**, *82*, 342-352, doi:10.1210/endo-82-2-342.
 68. Rindi, G.; Wiedenmann, B. Neuroendocrine neoplasia of the gastrointestinal tract revisited: towards precision medicine. *Nat Rev Endocrinol* **2020**, *16*, 590-607, doi:10.1038/s41574-020-0391-3.
 69. Florio, T.; Casagrande, S.; Diana, F.; Bajetto, A.; Porcile, C.; Zona, G.; Thellung, S.; Arena, S.; Pattarozzi, A.; Corsaro, A., et al. Chemokine stromal cell-derived factor 1alpha induces proliferation and growth hormone release in GH4C1 rat pituitary adenoma cell line through multiple intracellular signals. *Mol Pharmacol* **2006**, *69*, 539-546, doi:10.1124/mol.105.015255.
 70. Barbieri, F.; Pattarozzi, A.; Gatti, M.; Porcile, C.; Bajetto, A.; Ferrari, A.; Culler, M.D.; Florio, T. Somatostatin receptors 1, 2, and 5 cooperate in the somatostatin inhibition of C6 glioma cell proliferation in vitro via a phosphotyrosine phosphatase-eta-dependent inhibition of extracellularly regulated kinase-1/2. *Endocrinology* **2008**, *149*, 4736-4746, doi:10.1210/en.2007-1762.

71. Florio, T.; Thellung, S.; Corsaro, A.; Bocca, L.; Arena, S.; Pattarozzi, A.; Villa, V.; Massa, A.; Diana, F.; Schettini, D., et al. Characterization of the intracellular mechanisms mediating somatostatin and lanreotide inhibition of DNA synthesis and growth hormone release from dispersed human GH-secreting pituitary adenoma cells in vitro. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2003**, *59*, 115-128.
72. Gatti, M.; Solari, A.; Pattarozzi, A.; Campanella, C.; Thellung, S.; Maniscalco, L.; De Maria, R.; Wurth, R.; Corsaro, A.; Bajetto, A., et al. In vitro and in vivo characterization of stem-like cells from canine osteosarcoma and assessment of drug sensitivity. *Exp Cell Res* **2018**, *363*, 48-64, doi:10.1016/j.yexcr.2018.01.002.
73. Wurth, R.; Barbieri, F.; Pattarozzi, A.; Gaudenzi, G.; Gatto, F.; Fiaschi, P.; Ravetti, J.L.; Zona, G.; Daga, A.; Persani, L., et al. Phenotypical and Pharmacological Characterization of Stem-Like Cells in Human Pituitary Adenomas. *Mol Neurobiol* **2017**, *54*, 4879-4895, doi:10.1007/s12035-016-0025-x.
74. Ludvigsen, E.; Carlsson, C.; Tiensuu Janson, E.; Sandler, S.; Stridsberg, M. Somatostatin receptor 1-5; expression profiles during rat development. *Ups J Med Sci* **2015**, *120*, 157-168, doi:10.3109/03009734.2015.1035413.
75. Bajetto, A.; Pattarozzi, A.; Corsaro, A.; Barbieri, F.; Daga, A.; Bosio, A.; Gatti, M.; Pisaturo, V.; Siritto, R.; Florio, T. Different Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Glioblastoma Stem Cells by Direct Cell Interaction or Via Released Soluble Factors. *Front Cell Neurosci* **2017**, *11*, 312, doi:10.3389/fncel.2017.00312.
76. Chou, T.C.; Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **1984**, *22*, 27-55, doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4.
77. Topaly, J.; Zeller, W.J.; Fruehauf, S. Synergistic activity of the new ABL-specific tyrosine kinase inhibitor STI571 and chemotherapeutic drugs on BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia* **2001**, *15*, 342-347, doi:10.1038/sj.leu.2402041.
78. Chou, T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* **2010**, *70*, 440-446, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
79. Murray, R.D.; Kim, K.; Ren, S.G.; Lewis, I.; Weckbecker, G.; Bruns, C.; Melmed, S. The novel somatostatin ligand (SOM230) regulates human and rat anterior pituitary hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **2004**, *89*, 3027-3032, doi:10.1210/jc.2003-031319.
80. Ren, S.G.; Taylor, J.; Dong, J.; Yu, R.; Culler, M.D.; Melmed, S. Functional association of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in inhibiting human growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **2003**, *88*, 4239-4245, doi:10.1210/jc.2003-030303.
81. Ben-Shlomo, A.; Schmid, H.; Wawrowsky, K.; Pichurin, O.; Hubina, E.; Chesnokova, V.; Liu, N.A.; Culler, M.; Melmed, S. Differential ligand-mediated pituitary somatostatin receptor subtype signaling: implications for corticotroph tumor therapy. *J Clin Endocrinol Metab* **2009**, *94*, 4342-4350, doi:10.1210/jc.2009-1311.
82. Schmid, H.A.; Brueggen, J. Effects of somatostatin analogs on glucose homeostasis in rats. *J Endocrinol* **2012**, *212*, 49-60, doi:10.1530/JOE-11-0224.
83. Kugita, M.; Nishii, K.; Yamaguchi, T.; Suzuki, A.; Yuzawa, Y.; Horie, S.; Higashihara, E.; Nagao, S. Beneficial effect of combined treatment with octreotide and pasireotide in PCK rats, an orthologous model of human autosomal recessive polycystic kidney disease. *PLoS One* **2017**, *12*, e0177934, doi:10.1371/journal.pone.0177934.
84. Cuny, T.; Zeiller, C.; Bidlingmaier, M.; Defilles, C.; Roche, C.; Blanchard, M.P.; Theodoropoulou, M.; Graillon, T.; Pertuit, M.; Figarella-Branger, D., et al. In vitro impact of pegvisomant on growth hormone-secreting pituitary adenoma cells. *Endocr Relat Cancer* **2016**, *23*, 509-519, doi:10.1530/ERC-16-0140.

85. Peverelli, E.; Giardino, E.; Mangili, F.; Treppiedi, D.; Catalano, R.; Ferrante, E.; Sala, E.; Locatelli, M.; Lania, A.G.; Arosio, M., et al. cAMP/PKA-induced filamin A (FLNA) phosphorylation inhibits SST2 signal transduction in GH-secreting pituitary tumor cells. *Cancer Lett* **2018**, *435*, 101-109, doi:10.1016/j.canlet.2018.08.002.
86. Hubina, E.; Nanzer, A.M.; Hanson, M.R.; Ciccarelli, E.; Losa, M.; Gaia, D.; Papotti, M.; Terreni, M.R.; Khalaf, S.; Jordan, S., et al. Somatostatin analogues stimulate p27 expression and inhibit the MAP kinase pathway in pituitary tumours. *Eur J Endocrinol* **2006**, *155*, 371-379, doi:10.1530/eje.1.02213.
87. Peverelli, E.; Giardino, E.; Treppiedi, D.; Catalano, R.; Mangili, F.; Locatelli, M.; Lania, A.G.; Arosio, M.; Spada, A.; Mantovani, G. A novel pathway activated by somatostatin receptor type 2 (SST2): Inhibition of pituitary tumor cell migration and invasion through cytoskeleton protein recruitment. *Int J Cancer* **2018**, *142*, 1842-1852, doi:10.1002/ijc.31205.
88. Tulipano, G.; Soldi, D.; Bagnasco, M.; Culler, M.D.; Taylor, J.E.; Cocchi, D.; Giustina, A. Characterization of new selective somatostatin receptor subtype-2 (sst2) antagonists, BIM-23627 and BIM-23454. Effects of BIM-23627 on GH release in anesthetized male rats after short-term high-dose dexamethasone treatment. *Endocrinology* **2002**, *143*, 1218-1224, doi:10.1210/endo.143.4.8716.
89. Zatelli, M.C.; Tagliati, F.; Taylor, J.E.; Rossi, R.; Culler, M.D.; degli Uberti, E.C. Somatostatin receptor subtypes 2 and 5 differentially affect proliferation in vitro of the human medullary thyroid carcinoma cell line tt. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, *86*, 2161-2169, doi:10.1210/jcem.86.5.7489.
90. Ruscica, M.; Arvigo, M.; Gatto, F.; Dozio, E.; Feltrin, D.; Culler, M.D.; Minuto, F.; Motta, M.; Ferone, D.; Magni, P. Regulation of prostate cancer cell proliferation by somatostatin receptor activation. *Mol Cell Endocrinol* **2010**, *315*, 254-262, doi:10.1016/j.mce.2009.11.006.
91. Cuevas-Ramos, D.; Fleseriu, M. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol* **2014**, *52*, R223-240, doi:10.1530/JME-14-0011.
92. Nagel, F.; Doll, C.; Poll, F.; Kliewer, A.; Schroder, H.; Schulz, S. Structural determinants of agonist-selective signaling at the sst(2A) somatostatin receptor. *Mol Endocrinol* **2011**, *25*, 859-866, doi:10.1210/me.2010-0407.
93. Liu, Q.; Bee, M.S.; Schonbrunn, A. Site specificity of agonist and second messenger-activated kinases for somatostatin receptor subtype 2A (Sst2A) phosphorylation. *Mol Pharmacol* **2009**, *76*, 68-80, doi:10.1124/mol.108.054262.
94. Gatto, F.; Arvigo, M.; Amaru, J.; Campana, C.; Cocchiara, F.; Graziani, G.; Bruzzone, E.; Giusti, M.; Boschetti, M.; Ferone, D. Cell specific interaction of pasireotide: review of preclinical studies in somatotroph and corticotroph pituitary cells. *Pituitary* **2019**, *22*, 89-99, doi:10.1007/s11102-018-0926-y.

8. RINGRAZIAMENTI

Eccomi giunta alla fine di questa tesi, alla fine di questi tre anni di Dottorato, alla fine di questo percorso di maturazione professionale, e perché no anche personale, alla fine di un viaggio che spero fine non abbia. Mi ritengo fortunata ad aver trovato un *Team* così coeso, pieno di idee e di passione per il proprio lavoro. Ed è proprio grazie a questo che ogni giorno è stato, e spero sarà, unico e mai banale.

Innanzitutto, colgo l'occasione per ringraziare il Professor Diego Ferone per avermi accolta nel Suo laboratorio, dato la possibilità di lavorare a questo progetto e soprattutto fatto sentire parte del gruppo fin da subito.

In modo particolare, desidero ringraziare la mia mentore, la Dottoressa Marica Arvigo, la quale mi ha insegnato con grande entusiasmo tutte le sue conoscenze ed è stata il punto di riferimento per ogni dubbio, domanda o consiglio lungo tutto il mio percorso all'interno del laboratorio. Ringrazio il Dottor Federico Gatto, la cui presenza è stata fondamentale per la riuscita di questo progetto e il cui supporto mi ha aiutato durante questo lungo percorso. Senza di loro la stesura di questa tesi non sarebbe stata possibile.

Desidero ringraziare anche tutte le altre persone che hanno collaborato a questo progetto: Professor Tullio Florio, Professoressa Federica Barbieri, Professor Gianluigi Zona, Dottoressa Claudia Campana, Dottoressa Federica Nista, Dottoressa Agnese Solari, Dottoressa Adriana Bajetto, Dottor Gabriele Gaggero, Dottor Diego Criminelli Rossi, Dottor Alessandro Prior.

Vorrei ringraziare mia mamma Sabina, mio papà Mauro e mio fratello Alessio, per la loro presenza costante, per il loro appoggio incondizionato e per il loro supporto durante tutti questi anni. Siete i pilastri sui quali so di poter sempre contare. Vi voglio bene!

Desidero fare un ringraziamento particolare al mio futuro marito Matteo, per essermi stato accanto in ogni singolo momento di questo percorso per me molto importante, con dolcezza nei momenti di tristezza, con entusiasmo nella mia felicità, con giudizio nella mia follia (*sweet but a psycho*) e con amore sempre. D'altronde, tra poche settimane faremo una promessa che varrà tutti i giorni della nostra vita. Grazie di cuore!

In conclusione, vorrei ringraziare la mia famiglia, la famiglia di Matteo, in particolare Grazia e Roberto, e tutti i nostri amici per essere stati sempre al mio fianco.