Ana Paula Malinosk Casarini

Análogos da somatostatina na acromegalia: comparação
da resposta clínica, laboratorial e do volume tumoral com a
expressão dos subtipos dos receptores de somatostatina no tumor
somatotrófico

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Marcello Delano
Bronstein

São Paulo
2008

Resumo

Cerca de um terço dos pacientes acromegálicos são resistentes aos análogos da somatostatina (AS) clinicamente disponíveis, octreotida (OCT) e lanreotida. Esta resistência tem sido relacionada à redução da densidade e/ou diferente expressão de subtipos de receptores de somatostatina (SSTR). Há cinco subtipos de receptores conhecidos. Geralmente, os SSTR2 e SSTR5 são os subtipos mais expressos nos somatotrofinomas. Os AS apresentam alta afinidade de ligação ao SSTR2 e menor afinidade ao SSTR5. Este estudo analisa a expressão dos SSTR's em adenomas secretores de GH e a correlaciona com a resposta hormonal e do volume tumoral ao OCT-LAR. Analisamos 39 adenomas secretores de GH, 49% tendo sido tratados com OCT-LAR, como tratamento primário ou secundário. A expressão dos SSTR's foi analisada por RT-PCR em tempo real e através de imuno-histoquímica para o SSTR2. O SSTR mais expresso foi o SSTR5, seguido pelo SSTR3, SSTR2, SSTR1 e SSTR4. Os SSTR1 e SSTR2 foram mais expressos nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I. O SSTR3 foi mais expresso nos pacientes que apresentaram redução tumoral. Houve correlação positiva entre a porcentagem de redução tumoral e a expressão do SSTR1, SSTR2 e SSTR3. Adicionalmente, verificou-se correlação positiva entre a expressão do RNAm do SSTR2 e a positividade da membrana celular na imuno-histoquímica do SSTR2. Nosso estudo confirmou a associação entre a resposta do GH e IGF-I ao OCT-LAR e a presença do RNAm e a proteína do SSTR2 em somatotrofinomas. Este achado também foi demonstrado em relação à expressão do RNAm SSTR1.

Portanto, SSTR1 e SSTR3 podem ter um papel importante na redução de volume tumoral e, indiretamente, na secreção hormonal. Desta forma, novos AS, com maior afinidade aos SSTR1, SSTR3 e SSTR5, poderiam otimizar o tratamento clínico da acromegalia.

Abstract

About one third of acromegalic patients are resistant to the clinically available somatostatin analogs (SA), octreotide (OCT) and lanreotide. The resistance is related to density reduction or different expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR). There are five known receptor subtypes. SSTR2 and SSTR5 are generally the most expressed subtypes in somatotrophinomas. SA exhibits high binding affinity to SSTR2 and, less affinity, to SSTR5. This study analyzes SSTR's expression in GH-secreting adenomas, comparing to SA response, hormonal levels, and tumor volume. We analyzed 39 GH-secreting adenomas; 49% were treated with OCT-LAR as primary or secondary treatment. SSTR expression was investigated by real time RT-PCR and immunohistochemistry for SSTR2. The most expressed SSTR was SSTR5, followed by SSTR3, SSTR2, SSTR1, and SSTR4. SSTR1 and SSTR2 had higher expression in patients that had normalized GH and IGF-I. SSTR3 was more expressed in patients with tumor reduction. There was a positive correlation between the percentage of tumor reduction and SSTR1, SSTR2 and SSTR3 expression. Also, a positive correlation between SSTR2 mRNA expression and the immunohistochemical reactivity of SSTR2 on the cell membrane was found. Our study confirmed the association between the OCT-LAR response to GH and IGF-I and the presence of mRNA and SSTR2 protein in somatotrophinomas. Additionally, this finding was also demonstrated in relation to SSTR1 mRNA expression. Therefore, SSTR1 and SSTR3 could have an important function in tumor volume reduction and, indirectly, in hormone secretion. Consequently, new SA, with more

affinity to SSTR1, SSTR3 and SSTR5, may optimize clinical treatment of acromegaly.

Ana Paula Malinosk Casarini

Análogos da somatostatina na acromegalia: comparação
da resposta clínica, laboratorial e do volume tumoral com a
expressão dos subtipos dos receptores de somatostatina no tumor
somatotrófico

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Marcello Delano
Bronstein

São Paulo
2008

Dedico aos meus pais e minha
irmã por todo amor, carinho,
companheirismo, respeito e por
sermos esta família maravilhosa.

Agradecimentos

Ao meu pai Pedro Casarini Filho por todo amor, carinho, ensinamentos e por ser meu eterno exemplo de vida,

A minha mãe Eliana Malinosk Casarini pela inspiração de luta, garra e por todo amor e carinho,

A minha irmã Amanda Malinosk Casarini por todo carinho, amor e serenidade,

Ao meu futuro esposo Daniel Vicaria do Lago por compartilhar momentos e conquistas e por sempre estar ao meu lado,

Aos meus familiares pela eterna devoção e compreensão,

Ao Prof. Dr. Marcello D Bronstein por todos os conhecimentos e dedicação,

A Dra. Raquel Jallad por toda atenção, carinho e por ter acompanhado os pacientes,

A Dra. Emília M Pinto por sua dedicação e me auxiliar nas situações mais difíceis,

Ao Dr. Iberê Soares e Dr. Venâncio pela colaboração e realização da imuno-histoquímica,

A Dra. Nina NR Musolino pelo acompanhamento dos pacientes,

Ao Dr. Walter Cescato pelo auxílio na coleta dos fragmentos tumorais,

Ao Dr. Daniel Gianella e o laboratório LIM 25 pela oportunidade,

A Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça por tornar possível o desenvolvimento deste trabalho,

Aos pacientes o ensejo de nosso estudo,

E principalmente a Deus por ter proporcionado todos os momentos e a realização de mais uma etapa em minha vida.

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução.....	01
1.1. Acromegalia.....	01
1.2. Somatostatina e seus receptores.....	06
1.3. Análogos da somatostatina.....	11
2. Objetivos.....	15
3. Materiais e métodos.....	16
3.1. Pacientes.....	16
3.1.1. Amostra selecionada	16
3.1.2. Critérios de exclusão	17
3.1.3. Resposta ao tratamento.....	17
3.2. Métodos.....	18
3.2.1. Dosagens hormonais.....	18
3.2.2. Volume tumoral	18
3.2.3. Coleta do fragmento tumoral.....	19
3.2.4. Extração do RNA.....	19
3.2.5. Análise da integridade do RNA total.....	21
3.2.6. Quantificação do RNA.....	21
3.2.7. Purificação do RNA.....	22
3.2.8. RT-PCR em tempo real.....	22
3.2.9. Análise da integridade do produto qRT-PCR e seqüenciamento automático do material.....	23
3.2.10. Método $2^{-\Delta Ct}$	24
3.2.11. Micromatriz tecidual (TMA).....	25
3.2.12. Imuno-histoquímica.....	26
3.2.13. Análise da imuno-expressão.....	27
3.3. Análise estatística.....	28
4. Resultados.....	29
5. Discussão.....	33
6. Conclusões.....	42
7. Anexos.....	43
8. Referências bibliográficas.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática dos SSTRs na membrana plasmática.....	43
Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de internalização do complexo agonista receptor acoplado a proteína G.....	44
Figura 3 - Bloco de TMA constituído de cilindros de 0,6 mm de diâmetro com 0,4mm de diferença entre um cilindro e outro com 11 linhas e 11 colunas.....	49
Figura 4 – Curva de melting dos genes SSTR1-5 e GAPDH em duplicatas..	54
Figura 5 – Curva com diluições seriadas de RNAm proveniente de um pool de tecido hipofisário normal realizada em triplicata com o gene GAPDH.....	55
Figura 6 - Gráfico da eficiência de amplificação do gene SSTR2 e o controle interno (GAPDH).....	56
Figura 7 – Mediana da expressão dos SSTRs nos 39 fragmentos tumorais estudados.....	59
Figura 8 – Expressão do SSTR1 nos 39 fragmentos tumorais estudados.....	60
Figura 9 - Expressão do SSTR2 nos 39 fragmentos tumorais estudados.....	61
Figura 10 - Expressão do SSTR2 nos 39 fragmentos tumorais estudados....	62
Figura 11 - Expressão do SSTR2 nos 39 fragmentos tumorais estudados....	63
Figura 12 - Correlação positiva entre níveis GH Pré-cirúrgico e o maior diâmetro tumoral	64
Figura 13 - Correlação negativa entre o maior diâmetro tumoral e a idade...	65
Figura 14 - Mediana da expressão dos secretores GH e GH-PRL. Sendo o SSTR2 mais expresso nos tumores secretores de GH-PRL.....	66
Figura 15 - Mediana da expressão dos pacientes menores e maiores de 40 anos. Sendo o SSTR2 mais expresso nos pacientes maiores de 40 anos....	67
Figura 16 – Mediana da expressão dos SSTRs nos 19 fragmentos tumorais que realizaram tratamento com OCT-LAR.....	68
Figura 17 - Expressão do SSTR1 nos 19 fragmentos tumorais estudados que realizaram tratamento com OCT-LAR.....	69
Figura 18 - Expressão do SSTR2 nos 19 fragmentos tumorais que realizaram tratamento com OCT-LAR.....	70
Figura 19 - Expressão do SSTR3 nos 19 fragmentos tumorais que realizaram tratamento com OCT-LAR.....	71
Figura 20 - Expressão do SSTR5 nos 19 fragmentos tumorais que realizaram tratamento com OCT-LAR.....	72
Figura 21 – Mediana da expressão dos SSTRs nos 13 fragmentos tumorais que realizaram tratamento primário com OCT-LAR.....	73
Figura 22 - Expressão do SSTR1 nos 13 fragmentos tumorais estudados que realizaram tratamento primário com OCT-LAR.....	74
Figura 23 - Expressão do SSTR2 nos 13 fragmentos tumorais que realizaram tratamento primário com OCT-LAR.....	75
Figura 24 - Expressão do SSTR3 nos 13 fragmentos tumorais que realizaram tratamento primário com OCT-LAR.....	76
Figura 25 - Expressão do SSTR5 nos 13 fragmentos tumorais que	

realizaram tratamento primário com OCT-LAR.....	77
Figura 26 – Mediana de expressão do SSTR1 nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I e não normalizaram. Sendo mais expresso nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I.....	79
Figura 27 – Mediana de expressão do SSTR1 nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I e não normalizaram. Sendo mais expresso nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I.....	80
Figura 28 – Mediana de expressão do SSTR3 nos pacientes que apresentam redução tumoral e não apresentaram. Sendo mais expresso nos pacientes que apresentaram redução tumoral.....	82
Figura 29 – Correlação positiva com a expressão do SSTR1 e a porcentagem de redução tumoral.....	83
Figura 30 – Correlação positiva entre a expressão do SSTR2 e a porcentagem de redução tumoral.....	84
Figura 31 – Correlação positiva entre a porcentagem de redução tumoral e a expressão do RNAm do SSTR3.....	85
Figura 32 - Correlação positiva entre o tempo de tratamento e a porcentagem de redução tumoral.....	86
Figura 33 – Foto ilustrativa da imuno-histoquímica do SSTR2.....	87
Figura 34 – Correlação positiva entre a positividade da membrana da imuno-expressão da proteína e do RNAm do SSTR2.....	92
Figura 35 – Correlação positiva entre a completude da imuno-expressão da proteína e do RNAm do SSTR2.....	93
Figura 36 – Correlação positiva entre a intensidade da imuno-expressão da proteína e do RNAm do SSTR2.....	94
Figura 37 – Correlação positiva entre a positividade da membrana na IHC da proteína do SSTR2 e a expressão do RNA.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos 39 pacientes estudados tais como: sexo, idade, imunohistoquímica do tumor e maior diâmetro tumoral.....	45
Tabela 2 - Intervalo de tempo entre a retirada do fragmento tumoral durante o processo cirúrgico e a extração do RNA.....	47
Tabela 3 - Seqüências dos primers dos SSTRs e GAPDH obtidos através do auxílio do programa primer 3.....	48
Tabela 4 – Classificação dos cilindros de acordo com a análise das perdas.	50
Tabela 5 – Classificação dos cilindros em escalas semi-quantitativas de acordo com a positividade membranosa das células.....	51
Tabela 6 - Classificação da positividade dos cilindros de acordo com a completude.....	52
Tabela 7 - Classificação da positividade dos cilindros de acordo com a intensidade.....	53
Tabela 8 - Expressão do RNAm dos SSTRs nos tumores dos pacientes analisados por real time RT-PCR através do método $2^{-\Delta Ct}$	57
Tabela 9 – Características dos 19 pacientes estudados que realizaram tratamento com OCT-LAR tais como: sexo, idade, % ULNR IGF-I pré cirúrgico; % ULNR IGF-I pré OCT-LAR; % ULNR IGF-I pós OCT-LAR; GH pré cirúrgico; GH pré OCT-LAR; GH pós OCT-LAR e tempo de tratamento com OCT-LAR em meses.....	78
Tabela 10 – Pacientes que realizaram tratamento primário com OCT-LAR e sua respectiva porcentagem de redução do volume tumoral.....	81
Tabela 11 - Descrição dos pacientes perdidos na avaliação de expressão de SSTR2 por imuno-histoquímica em TMA, e descrição dos pacientes com duas espécimes.....	88
Tabela 12 - Descrição por classes de positividade para a imuno-expressão do SSTR2 (n=31).....	89
Tabela 13 - Descrição individual da imuno-expressão do SSTR2 (n=31).....	90
Tabela 14 - Expressão do RNAm do SSTR2 pelo método $2^{-\Delta Ct}$ por real time RT-PCR e imuno-expressão da proteína do SSTR2 por imunohistoquímica, bem como a positividade da membrana, completude e intensidade.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adenocorticotrófico
AIP	<i>Aryl Hydrocarbon receptor-interacting protein</i>
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
AS	Análogos da somatostatina
CDKI	Cinase dependente de ciclina
CKO-K1	<i>Chinese hamster ovary</i>
CNC	Complexo de Carney
CT	Limiar do ciclo, <i>threshold cycle</i>
D	Dopamina
D2R	Receptor de dopamina 2
DEPC	Dietilpirocarbonato de sódio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
eNOS	Óxido nítrico endotelial
GAPDH	Gliceraldeído trifosfato desidrogenase
GDP	Guanosina difosfato
GH	Hormônio de crescimento
GH-R	Receptor do hormônio de crescimento
GHRH	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
GHRPs	Peptídeo liberador do hormônio de crescimento
GHs	Secretagogos do hormônio de crescimento
GTP	Guanosina trifosfato
HSA	Atividade somatostatinérgica hipotalâmica
IFS	Acromegalia familiar isolada
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I
IRMA	Ensaio imunorradiométrico
MAP	Proteína ativada por mitógenos
MEN-1	Síndrome neoplásica endócrina múltipla tipo-I
NO	Óxido nítrico
Oct	Octreotide
Oct-LAR	Octreotide de longa duração
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	<i>Phosphoinositide</i>
Proteína G	Proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina
PRL	Prolactina
PTP	Fosfotirosinas fosfatases
qPCR	PCR quantitativa
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	RNA ribossomal

RT	Transcrição reversa
Sc	Subcutâneo
SPA	<i>Sodium-proton antiporter</i>
SRIF	Fator inibidor da liberação de somatotrofina
SST	Somatostatina
SSTR	Receptor de somatostatina
TBE	Tris-ácido bórico EDTA
TMA	Micromatriz tecidual
TNF alfa	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Hormônio Tiroestimulante
TTGo	Teste de tolerância a glicose oral
ng	Nanogramas
nM	Nanomolar

1. Introdução

1.1. Acromegalia

A acromegalia é uma doença rara com incidência estimada em três a quatro casos novos/milhão/ano e com prevalência de 40 a 70 casos por milhão de habitantes. É causada pela hipersecreção do hormônio de crescimento (GH) e conseqüente aumento do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) ¹.

A acromegalia decorre em 98 a 99 % dos casos, de um tumor hipofisário produtor de GH. O restante (1 a 2 %) resulta da hipersecreção do hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH), eutópica (hamartomas) ou ectópica (tumores carcinóides, pulmonares, pancreáticos e feocromocitomas) ².

Em cerca de 60 a 70 % dos casos, o somatotrofinoma é um adenoma puro de células somatotróficas, ou seja, produz apenas GH, podendo ser de crescimento lento menos agressivo (densamente granuloso) ou rápido (esparsamente granuloso). Os 30 a 40 % restantes são representados por adenomas mistos (cerca de 25 %), adenomas mamossomatotróficos (aproximadamente 10 %), adenomas acidófilos de células tronco (< 5 %) e adenomas plurihormonais (< 5 %). Os três primeiros tipos produzem GH e PRL ³.

Raramente podem ser familiar como parte da síndrome neoplásica endócrina múltipla tipo-1 (MEN-1) e do Complexo de Carney (CNC), ou ainda, como acromegalia familiar isolada (IFS - *isolated familial somatotropinoma*), recentemente relacionada a mutações do gene que codifica a *aryl hydrocarbon receptor-interacting protein* (AIP) ⁴.

Sua frequência é semelhante entre os sexos, podendo ocorrer em qualquer idade, porém com maior incidência entre terceira e quinta décadas de vida ¹. Seus sinais e sintomas surgem de forma lenta e progressiva, protelando o diagnóstico em aproximadamente dez anos na maioria dos casos ⁵. Os pacientes apresentam características somáticas, como protusão da fronte e da mandíbula, aumento dos arcos zigomáticos, separação dos dentes, má-oclusão dentária, aumento da língua, lábios e nariz, acentuação das linhas da face, aumento de partes moles, aumento das mãos e dos pés, alterações cutâneas (espessamento da pele, papilomas cutâneos, hiperidrose e pele oleosa). Quando a secreção excessiva do GH se inicia antes do fechamento das cartilagens de crescimento teremos o gigantismo, que pode ser associado a feições acromegálicas.

Atualmente o diagnóstico laboratorial segue as diretrizes do Consenso de Cortina D'Ampezzo ⁶. Na ausência de fatores que interfiram com as dosagens do GH e IGF-I, a acromegalia é excluída na presença de níveis séricos do GH randômico inferiores a 0,4 ng/mL e de IGF-I normal para idade e sexo. Caso um destes valores não seja alcançado, está indicada a dosagem do GH durante o teste de tolerância à glicose oral (TTGo). O diagnóstico da acromegalia é

confirmado pela ausência de supressão do GH para níveis menores que 1 ng/mL, quando dosado por ensaio que utiliza anticorpo monoclonal, ou menores que 2 ng/mL, quando utilizado anticorpo policlonal, e associados a níveis séricos elevados de IGF-I para idade e sexo ⁶. Nos raros casos de suspeita de acromegalia secundária à secreção ectópica do GHRH está indicada a dosagem sérica do GHRH. Após o diagnóstico clínico-laboratorial da acromegalia, a ressonância magnética da hipófise é o exame padrão ouro para identificação e caracterização do adenoma hipofisário.

A taxa de mortalidade nos pacientes acromegálicos é cerca de duas a três vezes maior quando comparada com a população geral ^{7,8}. O excesso prolongado do GH/IGF-I leva as várias complicações como doenças cardiovasculares e respiratórias (principalmente apnéia do sono) que respondem, respectivamente, por 60 e 25 % dos óbitos. Embora ainda existam controvérsias, admite-se maior prevalência de doenças neoplásicas (sobretudo no trato gastrointestinal) e cerca de 50 a 70 % dos pacientes apresentam intolerância à glicose e 10 a 25 % diabetes mellitus ⁹⁻¹².

O tratamento da acromegalia visa normalizar a mortalidade e reduzir a morbidade ¹³, atingindo níveis “seguros” do GH e normalizando os níveis de IGF-I. Adicionalmente, o tratamento objetiva eliminar os efeitos de massa provocados pelos macroadenomas (principalmente quadros visuais e cefaléia) e preservar ou mesmo recuperar a função hipofisária. Nas últimas décadas o tratamento da acromegalia apresentou grandes avanços, como o aperfeiçoamento da cirurgia hipofisária pela via transesfenoidal, novas técnicas

radioterápicas como a radiocirurgia e tratamento medicamentoso com agonistas dopaminérgicos, análogos da somatostatina (AS) e antagonistas do receptor do GH.

De acordo com o Consenso de Cortina D'Ampezzo, a acromegalia é considerada controlada quando ocorre supressão do GH menor que 1 ng/mL no TTGo e normalização de IGF-I em relação a idade e sexo ⁶. No entanto, para fins epidemiológicos GH menor que 2,5 ng/mL e/ ou normalização de IGF-I podem ser considerados como critério de controle da acromegalia ^{6,14}.

A cirurgia ainda é a principal escolha para o tratamento primário da acromegalia sendo geralmente realizada pela via transesfenoidal e menos freqüentemente pela via transcraniana. Apresenta eficácia maior para microadenomas, (adenomas menores que 10 mm) com controle do GH e IGF-I em 40 a 91 % dos casos ¹⁵. No entanto como 80 % dos adenomas produtores de GH são macroadenomas os resultados encontrados no controle destes são de apenas 23 a 53 % ^{1,6,9,16,17}. Entre as complicações cirúrgicas, o diabetes insipidus transitório pode ocorrer em até 30 % dos pacientes e permanente em menos do que 5 % dos casos. Outras complicações são fístula liquórica, sinusite, meningite e hipopituitarismo ¹⁸.

A radioterapia convencional apresenta como desvantagem o tempo necessário para a normalização do GH, geralmente sendo superior a 10 anos e para o controle em apenas 60 % dos pacientes ^{19,20}. A radioterapia conformacional em doses múltiplas ou únicas (radiocirurgia) propõe redução no tempo para a normalização, porém os dados ainda são insuficientes para esta

conclusão ²¹. Hipopituitarismo, lesões actínicas e aumento da incidência de doença cerebrovascular são complicações da radioterapia ^{20,22}.

O agonista dopaminérgico bromocriptina foi a primeira droga a ser utilizada com alguma eficácia no tratamento da acromegalia. Mais recentemente a quinagolida e, principalmente a cabergolina mostraram-se superiores à bromocriptina, porém com eficácia limitada na normalização do GH e IGF-I (10 a 40 %). Apresentam resposta terapêutica mais evidente nos pacientes que apresentam co-secreção do GH e PRL e naqueles com níveis menos elevados do GH e IGF-I ²³⁻³⁰.

Recentemente foi desenvolvido um antagonista do receptor do GH. O pegvisomanto é uma molécula peguilada modificada do GH com nove mutações, obtido pela técnica do DNA recombinante, que se liga ao receptor de GH (GH-R), prevenindo a ligação do GH nativo, e evitando a dimerização funcional do GH-R. Apesar da normalização de IGF-I em até 97 % dos pacientes, inclusive nos resistentes aos AS, existe um risco potencial de que o bloqueio do *feedback* de IGF-I possa promover o crescimento tumoral ^{9,31}.

O tratamento clínico atualmente considerado padrão-ouro é o que utiliza AS como o octreotide (OCT) e lanreotide (LAN). A partir de 1974 o Laboratório Sandoz iniciou estudos visando modificar a estrutura da somatostatina (SST) tornando-a conformacionalmente mais estável, com maior resistência à degradação enzimática. Surgiu então o SMS 201-995 OCT-sc, aplicação subcutânea (sc) com meia-vida de duas horas, necessitando de três aplicações diárias. Mais recentemente tornaram-se disponíveis AS de ação mais

prolongada como o OCT-LAR (*long acting release*), nas doses de 10, 20 ou 30 mg e aplicações por via intramuscular a cada 28 dias, LAN SR (*slow release*) com dose de 30 mg também por via intramuscular, porém em intervalos menores de 7 a 14 dias, e LAN autogel, nas doses de 60, 90 e 120 mg também administrados a cada 28 dias, por via sc profunda. Estas formas apresentam vantagens sobre a OCT sc devido à maior aderência e conforto do paciente ^{9,30,32-35}. A eficácia destas drogas na normalização do GH e IGF-I varia na literatura entre 60 a 70 % ^{36,37}. Pacientes parcialmente resistentes ao tratamento primário com OCT-LAR podem se tornar responsivos ao AS, após remoção cirúrgica parcial ³⁸.

1.2. Somatostatina e seus receptores

A SST é um peptídeo com várias ações fisiológicas, sendo primeiramente isolada e identificada como um inibidor da secreção de GH da hipófise anterior ³⁹. A SST apresenta outras funções tais como: inibição da secreção hormonal de vários outros hormônios como o hormônio tireoestimulante (TSH), adenocorticotrófico (ACTH), insulina, glucagon ^{40,41}. No sistema nervoso central atua como um neuromodulador, facilitando a regulação de neurotransmissores tais como a dopamina, neuroepinefrina e serotonina ⁴²; controla a proliferação celular normal, bem como em tecidos tumorais ^{43,44} e possui funções exócrinas tais como: inibição da secreção da amilase (pela glândula salivar), ácido hidrocloreídrico, pepsinogênio (pela mucosa

gastrointestinal), enzimas pancreáticas e bicarbonato (pelo pâncreas) e bile (pelo fígado). A SST regula a absorção intestinal de nutrientes e a motilidade gastro-intestinal de maneira complexa; adicionalmente apresenta potente ação imunomoduladora na atividade da secreção de células imunes como as imunoglobulinas produzidas pela ativação dos linfócitos B e produção de citocinas pela atividade dos linfócitos T e macrófagos ⁴⁵.

O gene que codifica a SST está localizado no cromossomo 3q28 ⁴⁶, sendo identificado por Brazeau e colaboradores em 1972. É sintetizado a partir de uma molécula precursora pré-pró-somatostatina. A pró-somatostatina em sua porção amino-terminal apresenta um peptídeo sinalizador de 24 aminoácidos (PS-24), sendo clivada e originando por mecanismo pós-traducionais duas isoformas biologicamente ativas SST-14 (forma predominante) e SST-28 ^{39,47}.

A SST age ligando-se a receptores específicos de membrana ⁴⁸. Existem cinco subtipos de SSTR's conhecidos: SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, e SSTR5 descobertos entre 1992 e 1994, pertencentes a "superfamília" acoplada a proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina (proteína G).

Os SSTR's possuem sete domínios transmembrânicos, suas regiões aminotermiais estão localizadas externamente à membrana citoplasmática enquanto as porções carboxiterminais estão situadas internamente a esta ⁴⁹. Os genes dos SSTR's estão localizados em cromossomos diferentes SSTR1 (14q13), SSTR2 (17q24), SSTR3 (22q13.1), SSTR4 (20p11.2) e SSTR5 (16p13.3), o que sugere terem funções diferentes ⁵⁰.

Os SSTR's exercem suas ações através de proteínas G que possuem três subunidades (alfa, beta e gama) ligadas à sua ativação e inativação intracelular. Na ausência do ligante, a subunidade alfa da proteína G do receptor apresenta-se ligada ao GDP (guanosina difosfato). A interação do ligante ao receptor desencadeia uma mudança conformacional do mesmo, fazendo com que ele adquira uma alta afinidade pelo complexo trimérico da proteína G (alfa, beta, gama). Com a associação ocorre dissociação do GDP, isso por sua vez, permite a ligação do GTP (guanosina trifosfato) na subunidade alfa e dissociação do alfa-GTP das subunidades beta/gama. O alfa-GTP se difunde na membrana e pode interagir com diferentes vias efectoras, tais como: adenilato ciclase, canais de cálcio, canais de potássio, fosfolipase C e A2, tirosina fosfatase (Figura 1) ^{50,51}. Os SSTR's podem ativar ou inativa estas vias como: inibição de adenilato ciclase (SSTR1 ao SSTR5); ativação dos canais de potássio (SSTR2 ao SSTR5); inibição dos canais de cálcio (SSTR1 e SSTR2); inibição (SSTR2, SSTR3 e SSTR5) e ativação (SSTR1 e SSTR4) da via MAP cinase; ativação de tirosina fosfatase (SSTR1 ao SSTR5); ativação do trocador Na^+/K^+ (SSTR1 e SSTR4); ativação da fosfolipase A2 (SSTR4); ativação da fosfolipase C/IP3 (SSTR1 ao SSTR5) ⁵¹.

A inibição da adenilato ciclase reduz a adenosina monosfosfato cíclica (AMPC), levando uma diminuição da exocitose. Os canais de potássio quando ativados, hiperpolarizam a membrana celular, com isso não ocorre o influxo de cálcio, diminuindo o cálcio intracelular levando a diminuição da exocitose. A ativação da via MAP cinase induz a fosforilação das proteínas envolvidas na

regulação dos genes necessários para a proliferação celular e sua inibição apresenta um efeito antiproliferativo. A ativação de tirosina fosfatase aumenta a expressão de um inibidor de cinase dependente de ciclina, o p21, que impede a progressão do ciclo celular. A ativação do trocador Na^+/H^+ está envolvida com a adesão, migração e proliferação celular. A ativação de fosfolipase A2 ativa a produção de ácido araquidônico. E a ativação de fosfolipase C/IP3 induz a parada do ciclo celular.

Evidências indicam que o SSTR1 está mais ligado a uma diminuição da progressão celular e angiogênese e aumento da expressão do p21. O SSTR2 induz a apoptose por mecanismos independentes de p53 e parece estar envolvido com a redução da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e com o aumento dos receptores da família $\text{TNF-}\alpha$ (fator de necrose tumoral alfa) inibindo a secreção do GH. O SSTR3 aparentemente se relaciona à via de apoptose induzindo o p53, enquanto o SSTR4 não possui função definida e o SSTR5, que inicialmente foi relacionado apenas com a diminuição do ciclo celular através da ativação da via fosfolipase C/IP3, e posteriormente com inibição da secreção do GH através da inibição da adenilato ciclase e ativação dos canais de potássio⁵²⁻⁶².

O mecanismo de internalização do complexo agonista SSTR foi descrito em muitos receptores ligados a proteína G⁶³⁻⁶⁶ e envolve associação do complexo receptor-hormônio em áreas especializadas da membrana. Os receptores da proteína G após a ativação dos agonistas são fosforilados,

através da proteína quinase A, proteína quinase C e quinases ligadas aos receptores da proteína G. Os receptores internalizados são diretamente levados ao endossoma e são desfosforilados, reciclados e voltam para a membrana plasmática como receptores funcionantes (re-sintetizados). Os receptores ligados a proteína G apresentam *down-regulation* através da degradação lisossomal dos receptores intracelulares, diminuição do RNAm e síntese da proteína do receptor, bem como a diminuição da degradação pela disposição direta dos receptores de membrana pelo compartimento lisossomal (Figura 2)⁶³.

As regiões do DNA que apresentam as seqüências codificadoras dos SSTR's não apresentam íntrons na sua seqüência, com exceção do SSTR2. O SSTR2 apresenta duas isoformas uma longa SSTR2a e uma curta SSTR2b derivadas de *splicing* alternativo por diferenças nas seqüências peptídicas por processamento pós-tradução^{67,68}.

1.3. Análogos da Somatostatina

O tratamento da acromegalia com AS baseia-se no fato que a SST é o principal neurohormônio inibidor da secreção do GH. Produzido no hipotálamo, é transportado através do sistema porta hipofisário para a hipófise, agindo nos somatotrofos inibindo a liberação de GH através dos SSTR's.

A meia vida da SST nativa é curta, cerca de três minutos, limitando seu uso na prática clínica. O desenvolvimento de AS com ação mais prolongada

como OCT-sc, OCT-LAR, LAN-SR e LAN-Autogel, trouxeram grandes avanços na terapia médica da acromegalia ⁶⁹⁻⁷¹. O OCT e LAN ligam-se preferencialmente ao SSTR2, com menor afinidade ao SSTR5 e SSTR3 e afinidade quase nula ao SSTR1 e SSTR4.

A resposta ao tratamento medicamentoso é relacionada à expressão dos subtipos do SSTR e, portanto, os pacientes mais responsivos ao OCT e LAN são aqueles cujos tumores expressam principalmente o SSTR2, enquanto que os adenomas de acromegálicos parcialmente resistentes ou refratários aos AS expressam principalmente outros subtipos do SSTR ou apresentam expressão muito baixa ou ausente de todos os receptores. Desta forma, o desenvolvimento de análogos específicos para outros subtipos de SSTR's poderiam resolver, pelo menos em parte, o problema da resistência ao OCT e LAN na acromegalia. Aproximadamente dois terços dos acromegálicos respondem aos AS comercialmente disponíveis ⁷¹. Os AS além de reduzirem os níveis do GH e IGF-I levam também com freqüência à redução do tumor. O tratamento com AS leva à normalização do GH e IGF-I em mais de 60 % dos pacientes acromegálicos, agindo diretamente através do SSTR2 e SSTR5. Entretanto, a redução tumoral é menos freqüente e geralmente não excede 50 % do volume tumoral, embora publicações recentes tenham revelado percentuais mais expressivos nessa redução ^{69,73}.

Os estudos avaliando o tratamento em longo prazo, com AS, OCT-LAR ⁷⁴⁻⁷⁶ ou LAN SR ⁷⁷ não mostraram taquifilaxia. Apenas em um estudo foi observado dessensibilização durante tratamento com OCT ⁷⁸.

Ao contrário dos adenomas somatotróficos, outros tumores, como tireotrofinomas e tumores neuroendócrinos apresentam sinais de dessensibilização ao tratamento com o AS. Os mecanismos responsáveis pela diferença de comportamento no desenvolvimento da taquifilaxia aos AS entre os somatotrofinomas e os outros tipos de tumores neuroendócrinos não estão ainda bem explicados, porém podem estar relacionados com diferenças nas expressões dos SSTR's, dessensibilização tecido-específico e/ou *down-regulation*, ou alternativamente, *up-regulation* tecido-específico resultando em respostas contínuas⁵².

Trabalhos recentes confirmam que a resposta ao AS é relacionada às diferenças nas subpopulações dos receptores, mostrando que os pacientes responsivos apresentam maior densidade do SSTR2, enquanto os menos ou não responsivos apresentam maior população do SSTR5 em relação ao subtipo SSTR2^{35,79-82}.

Os SSTR's mais freqüentemente expressos nos somatotrofinomas são o SSTR2 e SSTR5, sendo o SSTR5 o mais abundante^{53,72,83}. No entanto há controvérsias na literatura, pois alguns trabalhos demonstram a maior expressão do SSTR2⁵⁶. A expressão predominante do SSTR2 constitui a base do sucesso clínico na aplicação do OCT e LAN no controle dos sintomas envolvidos pela hipersecreção hormonal nos pacientes com adenomas hipofisários secretores de GH, tumores de ilhotas pancreáticas ou tumores carcinóides^{43,53,84}. Thodou e colaboradores demonstraram que o SSTR3 apresenta uma expressão variável entre os tumores somatotróficos e uma

maior expressão do SSTR4 o que difere de estudos prévios onde raros casos apresentam a expressão desse subtipo de receptor ⁸⁵.

A expressão dos SSTR's pode ser modulada através da presença de alguns hormônios. O hormônio tireoidiano aumenta o SSTR1 e o SSTR5 ⁸⁶, enquanto o estrógeno aumenta SSTR2 e SSTR3 e diminui SSTR4 e SSTR5 ⁸⁷. O glicocorticóide aumenta SSTR1 e SSTR2 se a exposição a este hormônio for por curto período, pois em longo prazo diminui a expressão desses subtipos ⁸⁸.

O tratamento da acromegalia ainda representa um desafio ao endocrinologista. O advento dos AS, OCT e LAN, determinou um grande impulso no tratamento clínico da acromegalia. No entanto, como já referido, cerca de 30 % dos pacientes não respondem adequadamente a estes análogos, que atuam principalmente via SSTR2 ⁷². Publicações recentes tem correlacionado a resposta aos análogos com a expressão dos SSTR's, mostrando baixa expressão do SSTR2 nos casos resistentes, e eficácia de análogos específicos para outros SSTR's, especialmente os do SSTR5, em tumores resistentes ^{35,72,81,82}. Adicionalmente, um análogo "universal", SOM 230 (Pasireotida) também tem mostrado eficácia na normalização do GH/IGF-I em alguns acromegálicos resistentes ao tratamento com OCT ⁸⁹.

Desta forma, a correlação entre a resposta clínica e a expressão dos SSTR's passa a ter grande importância para o direcionamento de AS com diferentes perfis. Esta comparação já foi objeto de alguns estudos, utilizando PCR convencional ou, mais recentemente, PCR em tempo real. No entanto, poucas publicações correlacionaram a expressão do RNAm dos SSTR's com as

respectivas proteínas, as quais em última análise efetivamente indicam a presença destes receptores nos tumores somatotróficos.

2. OBJETIVOS

- ✓ Analisar a expressão do RNAm dos SSTR's nos adenomas hipofisários produtores de GH de pacientes acromegálicos operados;
- ✓ Comparar a expressão dos SSTR's com os níveis e a resposta do GH e IGF-I em acromegálicos tratados com o AS OCT-LAR;
- ✓ Correlacionar a expressão dos SSTR's com o efeito do OCT-LAR sobre a redução tumoral.
- ✓ Correlacionar a expressão do RNAm com a proteína do SSTR2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Pacientes

3.1.1 Amostra selecionada

Foram selecionados 39 pacientes acromegálicos (23 mulheres), com mediana de idade de 43 anos (14 a 76 anos), provenientes dos ambulatórios de Neuroendocrinologia da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia e da Divisão de Neurocirurgia Funcional do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). As características dos pacientes estão resumidas na Tabela 1. Foi utilizado um pool de tecido hipofisário normal provenientes de fragmentos de tecidos humanos de autópsias, de três indivíduos.

O diagnóstico laboratorial da acromegalia foi realizado através da ausência de supressão do GH para níveis menores que 1 ng/mL durante o TTGo e IGF-I sérico elevado para idade e sexo. A presença de adenoma hipofisário foi avaliada através da ressonância magnética de sela túrcica. Todos os pacientes foram submetidos à cirurgia transesfenoidal durante a qual foram coletados os fragmentos tumorais. O exame histopatológico revelou a presença de um adenoma e o exame imuno-histoquímico confirmou ser um adenoma produtor de GH.

Dos 39 acromegálicos, dezenove pacientes (49 %) realizaram tratamento com AS (OCT-LAR) antes da cirurgia ou após insucesso cirúrgico, sendo divididos em grupo primário (treze pacientes) e grupo secundário (seis pacientes).

3.1.2 Critérios de exclusão:

3.1.1.1 Pacientes que realizaram radioterapia primária ou pós-cirúrgica, caso a resposta ao tratamento não tenha sido avaliada no pré-operatório;

3.1.1.2 Pacientes em tratamento combinado com AS e agonistas dopaminérgicos;

3.1.1.3 Pacientes com tempo de tratamento com AS inferior a três meses.

3.1.3. Resposta ao tratamento

A resposta ao AS foi avaliada pelas dosagens do GH e IGF-I durante o acompanhamento, sendo de três meses o prazo mínimo de tratamento.

Foram considerados responsivos aqueles pacientes que apresentaram níveis “seguros” do GH ($< 2,5$ ng/mL) e normalização de IGF-I (de acordo com a idade e sexo) .

3.2. Métodos

3.2.1. Dosagens hormonais

As dosagens hormonais foram realizadas pelo laboratório central da FMUSP.

Os níveis séricos do GH foram dosados por método imunofluorométrico com anticorpos monoclonais (AutoDELFIA™, Wallac® Turku, Finland). Este ensaio reconhece as formas 22 e 20k Da e os coeficientes de variações interensaio e intraensaio foram menores do que 10 %. A sensibilidade do ensaio é de 0,1 ng/mL e foi normatizados com o padrão internacional 80/505 da OMS (conversion factor for SI units, ng/ml $\times$ 2.6 = mIU/L).

Os níveis séricos de IGF-I foram determinados por método imunofluorométrico após extração com etanol (DSL, Webster, TX, USA) e os coeficientes de variações interensaio e intraensaio foram menores que 10 %. O IGF-I foi expresso como valor absoluto e com a porcentagem acima do limite superior da variação normal de IGF-I (% ULNR-IGF-I), considerando-se normal os valores iguais ou menores que 100 %.

3.2.2. Diâmetro tumoral

O maior diâmetro tumoral foi analisado através da ressonância magnética com imagens sagitais e coronais na região selar antes e após o tratamento com AS.

A porcentagem de redução tumoral foi analisada apenas nos pacientes tratados primariamente com AS, ficando excluídos desta análise aqueles submetidos à cirurgia primária, devido a artefatos próprios da manipulação cirúrgica.

3.2.3. Coleta do fragmento tumoral

Durante o ato cirúrgico, fragmentos tumorais foram coletados a fresco em condições estéreis em tubos de prolipropileno para congelamento, com volume de 2,0 mL, contendo 1,0 mL do reagente Trizol[®] (GIBCO, Life Technologies, Gaithersburg, EUA) e, em seguida, hermeticamente fechados e acondicionados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Outros fragmentos tumorais foram enviados para a análise histopatológica com coloração pela hematoxilina-eosina e complementada com estudo imuno-histoquímico para todos os hormônios adeno-hipofisários e subunidade alfa dos hormônios glicoproteicos pela técnica da peroxidase-antiperoxidase confirmando o diagnóstico clínico-laboratorial.

3.2.4. Extração do RNA

Os RNAs totais foram extraídos a partir dos fragmentos tumorais pelo método isotiocianato de guanidina descrito por Chomczynski e colaboradores⁹⁰.

O intervalo de tempo entre a retirada do fragmento tumoral durante o procedimento cirúrgico e a extração do RNA estão resumidos na tabela 2.

Os materiais recebidos em nitrogênio líquido foram fragmentados em um pulverizador de tecidos (Mikro-Dismembrenator II B. Braun. Melsugen, RFA). Aos materiais pulverizados foram adicionados 1 mL do reagente Trizol® (Gibco-BRL) e incubados por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio agitando vigorosamente por 15 seg e incubados por 2 min a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C (Hettich EBA 12 R. Tuttingen, RFA). Os sobrenadantes foram transferidos para um outro tubo estéril de 1,5 mL e os RNAs precipitados com adição de 500 µL de isopropanol.

As misturas foram deixadas em repouso durante 10 min e centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes removidos e os botões de RNAs lavados com 500 µL de etanol gelado à 70 %, centrifugados novamente e re-suspensos em um volume apropriado de água estéril tratada previamente com dietilpirocarbonato de sódio (DEPC) (Sigma) na concentração final de 0,1 %.

3.2.5. Análise da integridade do RNA total

A integridade dos RNAs totais foram avaliadas em gel de agarose a 1 % com desnaturação. Amostras de 20 µg de RNA foram re-dissolvidas em tampão MOPS/ formaldeído contendo 50 % de formamida, 5 % de azul de bromofenol e 5 mg/mL de brometo de etídeo, à eletroforese a 80 Volts em tampão TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) por 45 min. Foram utilizadas somente as amostras cujas bandas correspondentes ao RNA ribossomal (RNAr) 18S e 28S mostraram-se íntegras à análise sob luz ultravioleta.

3.2.6. Quantificação do RNA

As concentrações dos RNAs totais extraídos foram determinadas por espectrofotometria [GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia, LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia)]. A estimativa da quantidade de RNAs foram realizadas medindo-se a absorbância 260 nm e 280 nm, sendo a primeira leitura correspondente à quantidade de ácidos nucleicos (DNA e RNA) na amostra e a segunda a concentração protéica. A preparação dos RNAs foram consideradas livres de proteínas quando a relação $A_{260/280}$ encontravam-se entre 1,8 e 2,0. Somente amostras com relação $A_{260/280}$ entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas⁹¹.

3.2.7. Purificação do RNA

Os RNAs totais extraídos foram tratados com Dnase (Invitrogen, Deoxyribonuclease I, amplification grade) eliminando possíveis contaminações com DNA genômico. Utilizou 1 µg de RNA; 1 µL 10x DNase I Reaction Buffer e 1 U de DNase I, Amplification Grade incubados a temperatura ambiente por 15 min. Para inativar a DNase adicionou 1 µL de 25 mM EDTA solution e aquecidos à 65°C por 10 min. Após os RNAs foram mantidos a -80°C até sua utilização.

3.2.8. RT-PCR em tempo real

A RT-PCR em tempo real ou RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) foi realizada num termo ciclador fluorométrico (Rotor Gene 3000, Corbett Research, Austrália), sendo a fluorescência monitorada durante todos os ciclos da RT-PCR, na fase de anelamento, utilizando-se o método “*single step*” através do kit comercialmente disponível Quantitect SYBR® Green RT-PCR (Qiagen; GmbH, D Hilden). A transcriptase reversa ocorreu a 50°C por 30 min, seguida por 15 min a 95°C. Após este período a enzima transcriptase reversa é destruída e a DNA polimerase é ativada. As reações foram realizadas em 15 µL com volume de 80 ng de RNA; 1 nM de primer sense e anti-sense do gene controle interno e dos genes em estudo (SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 e

SSTR5); 2x Quant Text Syber Green e Quant Text RT mix (Qiagen; GmbH, D Hilden).

O gene controle interno utilizado foi o GAPDH (gliceraldeído trifosfato desidrogenase) sendo um dos genes mais comumente utilizados como “*housekeeping*”⁹².

Foram realizados trinta e cinco ciclos, cada ciclo apresentou 20 seg à 95°C (desnaturação), 30 seg à 60°C (anelamento) e 30 seg à 72°C (extensão).

Todas as reações foram realizadas em duplicatas, contendo cada gene em uma amostra num mesmo ensaio, evitando possíveis diferenças entre ensaios. Em todas as reações foram utilizados um pool de hipófises normais como controle positivo e um controle negativo (ausência de RNA).

Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes validados foram obtidos com o auxílio do programa Primer 3 (ROZEN, SKALETSKY)⁹³ (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) (Tabela 3).

3.2.9. Análise da Integridade do produto qRT-PCR e seqüenciamento automático do material

A integridade dos produtos de qRT-PCR foram avaliadas em gel de agarose 1,5 % para certificarmos a ausência de produtos inespecíficos, dímeros de primer e apenas a determinação do produto com o seu respectivo tamanho. Após a análise do gel de agarose, 5 µL do produto qRT-PCR foram tratados com 2 mL de ExoSap-IT (Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland, Ohio, USA)

por 15 seg à 37°C e 15 min à 80°C e diretamente seqüenciados usando o Kit comercialmente disponível BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e analisado no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer Automatic DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.2.10. Método $2^{-\Delta CT}$

Os valores quantitativos foram obtidos pelos valores de C_T (*threshold cycle*) ou limiar do ciclo, no qual o aumento no sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto de qRT-PCR começa a ser detectada⁹⁴. Em cada reação, será utilizado um controle interno (GAPDH), para o controle da quantidade e da qualidade do RNA.

Foi necessário a determinação inicial da eficiência de amplificação do gene alvo e do gene controle interno, para utilizar o método comparativo ou $2^{-\Delta CT}$. Para tanto foi realizado uma curva para cada um dos genes estudados, com diluições seriadas do RNAm provenientes de um pool de quatro hipófises normais e posterior amplificação do gene alvo, bem como do gene controle interno (GAPDH). Todas as diluições seriadas foram posteriormente amplificadas por qRT-PCR.

A comparação da eficiência de amplificação dos dois genes foi realizada da seguinte maneira: subtraiu-se os valores de C_T do gene alvo dos valores de

C_T do gene controle interno; a diferença foi colocada contra o logaritmo da quantidade da amostra inicialmente colocada, se a inclinação da reta ou (*slope*), for menor que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, assim a utilização do método comparativo $2^{-\Delta C_T}$ é viável.

Após a verificação da eficiência de amplificação dos genes calculou-se inicialmente o ΔC_T de cada amostra, subtraindo-se os valores de C_T do gene alvo dos valores de C_T do gene controle interno. Após determinação do ΔC_T da amostra, aplica-se a fórmula $2^{-\Delta C_T}$ 95,96.

3.2.11. Micromatriz tecidual (TMA)

Micromatriz tecidual (TMA) é uma coleção de amostras de diferentes tecidos em um único bloco de parafina. Essa técnica é rápida, barata e permite a separação em larga escala de materias de histoquímica, imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e hibridização fluorescente *in situ* 97-100.

Cortes histológicos representativos das amostras dos tumores secretores de GH, corados por hematoxilina e eosina foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores dos tecidos, cilindros de 0,6 mm de diâmetro das áreas marcadas foram transportados para um único bloco de parafina receptor através de um sistema mecanizado de precisão (Beecher Instruments), com um intervalo de 0,4 mm entre os cilindros. Cada cilindro

amostral foi alocado numa posição do bloco receptor definida num sistema cartesiano de coordenadas, e o conjunto das amostras constituiu uma TMA com 11 linhas e 11 colunas (Figura 3).

No total, o TMA construído apresentou 86 posições (76 amostras de 38 espécimes, com 02 amostras por espécime; 10 amostras de hipófise normal e espaços em branco foram usados para determinar o posicionamento do TMA, além de servirem como controle negativo). Uma vez pronto, o bloco de TMA, foi cortado em secções histológicas de 3 μ m (Leica Instruments).

3.2.12. Imuno-histoquímica

Para a avaliação do SSTR2 e SSTR5 por imuno-histoquímica, foi utilizada duas lâminas, sendo uma lâmina considerada como principal e a outra réplica para resgates. Os cilindros foram classificados de acordo com a análise das perdas (Tabela 4). Sendo considerado perda tanto a ausência física do tecido quanto sua substituição por tecido não informativo como, por exemplo, tecido hipofisário normal. Foram considerados perdidos os espécimes que apresentavam nas duas amostras das duas lâminas perda maior ou igual a três.

Para a realização das reações imuno-histoquímicas, as lâminas foram inicialmente desparafinizadas. Após, procedeu-se à recuperação antigênica por calor úmido (tampão citrato 0,01 M, pH 6,0 em panela de pressão), seguida por bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 20 V, e por incubação *over-night* com soro policlonal de coelho anti-SSTR2 contendo 200

μg IgG em 1,0 mL de PBS com $< 0,1 \%$ ácido sódico e $0,1 \%$ gelatina (sc-25676 da Santa Cruz Biotechnology) como anticorpo primário no título de 1:100; na seqüência, houve incubação com Envision Plus (Dako) como polímero acoplado a peroxidase para detecção e amplificação da reação imuno-histoquímica na lâmina principal. Na lâmina réplica utilizou-se NovoLink (Novocastra) como polímero curto de detecção acoplado à peroxidase. A revelação das reações foi realizada com diaminobenzidina como cromógeno a 60 mg% em tampão fosfato pH 7,4.

O mesmo procedimento foi realizado com soro policlonal de coelho anti-SSTR5 contendo 200 μg IgG em 1,0 mL de PBS com $< 0,1 \%$ ácido sódico e $0,1 \%$ gelatina (sc-25679 da Santa Cruz Biotechnology).

3.2.13. Análise da imuno-expressão

Para a avaliação da imuno-expressão do SSTR2, os cilindros foram classificados de acordo com a positividade membranosa das células em escalas semi-quantitativas (Tabela 5). A positividade foi avaliada em sua completude (Tabela 6) e intensidade (Tabela 7).

Cada espécime foi representado no bloco de TMA através de duas amostras, escolhendo-se o cilindro com maior positividade para sua representação, dentro da mesma positividade, o de maior intensidade.

Todas as análises foram realizadas por dois patologistas que não tiveram acesso aos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes e apresentaram uma concordância na avaliação de 100 % na análise das imuno-expressões.

3.3. Análise estatística

A análise estatística na comparação dos SSTR's foi realizada pelo método de Mann-Whitney e as correlações pela análise de correlação de Spermann. A significância foi atingida quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

As seqüências amplificadas por qRT-PCR foram confirmadas através da corrida em gel de agarose, curva de melting (Figura 4) e por seqüenciamento automático. A eficiência de amplificação dos SSTR's em relação ao GAPDH foram menores que 0,1 tornando possível o uso do método comparativo $2^{-\Delta CT}$ em todos os genes analisados (Figuras 5 e 6).

Dos 39 tumores extraídos dos pacientes operados, o SSTR mais freqüentemente expresso foi o SSTR5 [4,17 (0,08 – 32,21)]; seguido do SSTR3 [1,77 (0,06 – 14,32)]; SSTR2 [0,48 (0,01 – 9,17)]; SSTR1 [0,09 (0,00 – 7,06)] e SSTR4 [0,00 (0,00 – 0,04)] (Figuras 7 a 11) (Tabela 8).

As dosagens do GH pré-cirúrgico correlacionaram-se positivamente com o maior diâmetro tumoral ($r = 0,604$ e $p = 0,01$) (Figura 12) havendo correlação negativa entre o maior diâmetro tumoral e a idade ($r = -0,513$; $p = 0,035$) (Figura 13).

Entre todos os tumores estudados, 29 eram tumores que co-secretavam GH/PRL e 10 tumores exclusivamente secretores de GH. O SSTR2 foi mais expresso nos tumores co-secretores de GH/PRL quando comparados com os exclusivamente secretores de GH (mediana 0,04 vs. 0,58 $p = 0,01$) (Figura 14), bem como nos pacientes com mais de 40 anos, quando comparados com pacientes abaixo desta faixa etária (mediana 0,19 vs. 0,93 $p = 0,02$) (Figura 15).

Estas diferenças significantes não foram encontradas nos outros subtipos de SSTR's.

Nos 19 pacientes que realizaram tratamento com OCT-LAR o SSTR mais freqüentemente expresso também foi o SSTR5 [5,80 (0,08 – 22,20)]; seguido do SSTR3 [3,20 (0,13 – 14,32)]; SSTR2 [0,48 (0,03 – 4,77)]; SSTR1 [0,10 (0,00 – 0,50)] e SSTR4 [0,00 (0,00 – 0,04)] (Figura 16 a 20). E nos pacientes que realizaram tratamento primário com OCT-LAR o SSTR mais freqüentemente expresso foi o SSTR5 [5,80 (0,08 – 22,20)]; seguido do SSTR3 [3,57 (0,13 – 8,19)]; SSTR2 [0,55 (0,03 – 4,77)]; SSTR1 [0,10 (0,0 – 0,50)] e SSTR4 [0,00 (0,00 – 0,04)] (Figuras 21 a 25).

Portanto, não houve diferença na ordenação das expressões em relação ao grupo total de pacientes, porém o número de casos a serem comparados necessita ser aumentado, pois a análise estatística não demonstrou esta relação. A mediana de tempo de tratamento com OCT-LAR foi 23 (5 a 71) meses, a dose utilizada foi 30 mg com exceção de dois casos que utilizaram a dose de 20 mg (pacientes 14 e 15).

Cinquenta e três por cento dos pacientes foram responsivos ao tratamento com OCT-LAR. As dosagens do GH e IGF-I desses pacientes estão resumidas na Tabela 9.

A mediana da expressão dos SSTR's, com exceção do SSTR4, foram altas nos pacientes que apresentaram boa resposta ao tratamento com OCT-LAR.

Quando comparamos os pacientes que normalizaram e não normalizaram GH e IGF-I foram encontradas diferenças significantes na expressão dos SSTR1 (Figura 26) e SSTR2 (Figura 27) (mediana: 0,17 vs. 0,09, $p = 0,04$; e 0,91 vs. 0,19, $p = 0,03$) respectivamente .

Nos pacientes submetidos à terapia primária com AS 69 % apresentaram redução tumoral maior ou igual a 25 % (Tabela 10).

Quando comparamos os pacientes com e sem redução tumoral diferenças significantes foram encontradas em relação à expressão do SSTR3 (mediana: 3,9 vs. 0,75, $p = 0,03$) respectivamente (Figura 28). A porcentagem de redução tumoral apresentou uma correlação positiva com a expressão do SSTR1 ($r = 0,629$; $p = 0,03$) (Figura 29), com o SSTR2 ($r = 0,612$; $p = 0,04$) (Figura 30) e com o SSTR3 ($r = 0,565$; $p = 0,04$) (Figura 31), não apresentando com os SSTR4 e SSTR5. Bem como houve uma correlação positiva entre o tempo de tratamento e a porcentagem de redução tumoral ($r = 0,607$; $p = 0,02$) (Figura 32).

Na avaliação imuno-histoquímica do SSTR2 (Figura 33), as perdas resultaram em dois novos espécimes/pacientes perdidos, sendo 31 o número final de pacientes analisados, desses 31, 26 com uma espécime e cinco com duas espécimes, com ganho de 83,8%, e perda total de seis pacientes/espécimes, descritos na tabela 11.

Os resultados das imuno-expressões do SSTR2 encontram-se descritos nas tabelas 12 a 14. Houve correlação positiva entre a expressão do RNAm do SSTR2 e a positividade da membrana na IHC do SSTR2 ($r = 0,594$ e $p = 0,001$)

(Figura 34), bem como em relação a completude ($r = 0,549$ e $p = 0,002$) e intensidade ($r = 0,470$ e $p = 0,009$) (Figuras 35 e 36). No grupo que realizou tratamento primário com OCT-LAR também foi observado uma correlação positiva entre a positividade da membrana para o anticorpo anti-SSTR2 e a expressão do RNAm deste mesmo subtipo ($r = 0,688$ e $p = 0,01$) (Figura 37).

A análise das imuno-expressões do SSTR5 não foram consideradas, pois o anticorpo não se mostrou específico para o SSTR5.

5. DISCUSSÃO

O perfil de expressão dos SSTR's em adenomas somatotróficos ainda é controverso na literatura. Em nossa casuística o SSTR mais freqüentemente expresso foi o SSTR5 o que está de acordo com outros estudos ^{53,81,83} existindo, no entanto, publicações demonstrando que o SSTR2 é o subtipo mais expresso, seguido do SSTR5 ^{43,52,101,102}. Diferentemente da literatura, em nosso estudo o segundo mais expresso foi o SSTR3 seguido do SSTR2, SSTR1 e SSTR4 ¹⁰³.

Os valores basais do GH e IGF-I não apresentaram correlação entre as expressões dos SSTR's. Isto está de acordo com Park e colaboradores que também não encontraram correlação entre a expressão do SSTR2 e SSTR5 os níveis basais do GH, sugerindo que a secreção basal deste hormônio não é determinada pela expressão dos SSTR's ¹⁰⁴.

A correlação positiva dos níveis pré-cirúrgicos do GH e o maior diâmetro tumoral é esperada, pois em geral quanto maior o volume tumoral potencialmente maior a capacidade de síntese e secreção do hormônio ¹⁰⁵. A correlação negativa entre o maior diâmetro tumoral e a idade pode ser explicada pela relação inversa entre o grau de agressividade e a idade, ou seja, tumores de pacientes mais jovens tendem a ser maiores e mais invasivos do que adenomas de pacientes com maior faixa etária ^{106,107}.

Em nossa casuística houve maior frequência de adenomas co-secretores de GH/PRL em relação aos adenomas exclusivamente secretores de GH, diferentemente da literatura onde a maioria dos tumores é exclusivamente secretor de GH ¹⁰⁸.

Quando dividimos os pacientes com adenomas com expressão imuno-histoquímica apenas para GH e adenomas com expressão imuno-histoquímica para GH e PRL verificamos que os co-secretores apresentam maior expressão do SSTR2. A literatura não demonstra esta diferença, nesses dois tipos de tumores somatotróficos ^{85,109}. Tumores co-secretores apresentam maior expressão do SSTR5; seguida do SSTR2 e SSTR1, estando à diminuição dos níveis do GH durante o tratamento com AS correlacionada com a expressão do SSTR2 e a queda nos níveis da PRL ao SSTR5 ¹⁰⁹. Estudo prévio demonstra que os tumores co-secretores apresentam maior resposta ao análogo do SSTR5 ¹¹⁰. Shimon e colaboradores demonstraram que em prolactinomas ocorreu maior supressão da PRL através do ligante específico SSTR5 ¹¹¹.

O presente estudo demonstrou maior expressão do SSTR2 em pacientes com idade superior a 40 anos quando comparados ao grupo etário até esta idade. Não há dados na literatura que demonstrem diferença na expressão entre os SSTR's de acordo com a idade. Em idosos predominam os somatotrofinomas densamente granulados, de crescimento lento e pouco agressivo. Ezzat e colaboradores mostraram que o efeito inibitório do OCT sobre a secreção do GH é significativamente maior em pacientes portadores de somatotrofinomas densamente granulados em comparação com pacientes

portadores de adenomas esparsamente granulados. Adicionalmente, van Der Lely e colaboradores demonstraram que pacientes com maior faixa etária (especialmente do sexo masculino) tendem a apresentarem maior sensibilidade ao OCT , que apresenta afinidade preferencial pelo SSTR2¹¹².

No grupo que realizou tratamento primário com AS o SSTR mais freqüentemente expresso também foi o SSTR5; seguido do SSTR3; SSTR2; SSTR1 e SSTR4. A semelhança entre estas freqüências de expressões dos SSTR's, ao grupo geral de trinta e nove acromegálicos (sendo metade não tratados com AS), sugere a não existência de "*down-regulation*" do receptor, que poderia ter sido induzida pelo tratamento com AS.

Cinquenta e três por cento dos pacientes que realizaram tratamento com AS foram responsivos ao tratamento. Esses dados são corroborados em um estudo brasileiro onde 74 % dos pacientes apresentaram redução do GH < 2,5 ng/mL e 41 % apresentaram normalização de IGF-I ⁷³. Yang e colaboradores apresentaram em seu estudo uma boa resposta ao OCT-LAR em 57 % dos pacientes ¹⁰⁹. Uma meta análise realizada por Freda e cols mostrou 57 % de normalização do GH e 67 % de IGF-I em acromegálicos tratados com OCT-LAR ⁶⁹.

Vários estudos demonstraram que a refratariedade ou resistência parcial dos somatotrofinomas aos AS está ligada a uma baixa expressão do SSTR2 ^{104,113-115}. Este achado está em concordância com o papel chave do SSTR2 na inibição da liberação do GH. No entanto, deve ser lembrado que além do nível de expressão do SSTR2, outros mecanismos estão envolvidos na sensibilidade

dos somatotrofinomas aos AS. Os adenomas somatotróficos associados a mutações na proteína gsp respondem melhor aos AS do que os adenomas em que esta mutação não é observada. Embora não se observe diferença na expressão do SSTR2 nestas duas categorias de tumores ¹¹⁶. Porém na literatura estes dados são controversos, pois alguns autores demonstram a não diferença na resposta do tratamento com AS em pacientes com e sem mutação gsp ¹¹⁷. Em tumores parcialmente responsivos, um efeito supressivo adicional pode ser observado com a associação de análogos específicos SSTR2 e SSTR5 ¹¹¹. Em estudo *in vitro* a combinação da atividade do SSTR2 e SSTR5 confere alta eficácia na supressão do GH nas células tumorais ¹¹⁸. Além disso, a maioria dos tumores parcialmente responsivos ao OCT, respondem melhor *in vitro* ao análogo bi específico SSTR2/SSTR5 ou aos quiméricos SSTR2/D2R e SSTR2/SSTR5/D2R ^{81,82,114,119}.

A expressão dos SSTR's no controle do GH e IGF-I em resposta ao tratamento com OCT-LAR não foi diferente no grupo primário em relação ao grupo secundário. Esses mesmos dados já foram demonstrados por Newman e colaboradores onde os níveis de IGF-I foram normalizados durante a terapia primária com AS em 68 % dos pacientes e em terapia secundária em 62 %, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos bem como na redução do GH ¹²⁰.

Observamos que 69 % dos pacientes que realizaram tratamento primário com OCT-LAR apresentaram redução tumoral maior que 25 % sendo a mediana de redução tumoral de 59 % (14 a 97 %). Uma compilação da

literatura mostrou uma média de 51 % (6 a 92 %) de redução tumoral em relação ao volume original ¹²¹.

Essa alta porcentagem de redução tumoral verificada em nossos pacientes poderia ser explicada pela elevada expressão dos SSTR5 e SSTR3, já que o SSTR5 está envolvido com a inibição do ciclo celular e secreção do GH e o SSTR3 com apoptose. Esses achados são semelhantes ao encontrados por Cozzi e colaboradores, onde 77 % dos pacientes apresentaram redução tumoral, variando entre 25 a 70 % de redução ¹²².

A porcentagem de redução tumoral não apresentou correlação com o decréscimo dos níveis do GH e IGF-I, constatação já descrita na literatura ¹²⁰.

A maior expressão do SSTR2 nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I, em relação aos que não normalizaram, já foi claramente demonstrada na literatura. Taboada e colaboradores demonstraram correlação positiva com o SSTR2 e a porcentagem de redução do GH em pacientes que realizaram tratamento com AS durante três e seis meses, e uma correlação positiva com a expressão do SSTR2 e a porcentagem de redução do IGF-I após os seis meses de tratamento com AS ⁵³.

Shimon e colaboradores estudaram em cultura de células de somatotrofinomas o efeito na supressão do GH dos análogos com ação preferencial ao SSTR2, incluindo OCT e LAN, e novos componentes desenvolvidos por Biomeasure Inc com combinação seletiva do SSTR2 (BIM 23197) e combinação seletiva ao SSTR5 (BIM 23268). Este estudo revelou que os novos análogos são 30 a 40 % mais potentes que o OCT e o LAN na

supressão do GH. Análogos heterólogos contendo a combinação seletiva de ambos SSTR2 e SSTR5 formulados em concentrações equimolares foram ainda mais potentes na redução da secreção do GH do que os SSTR2 e/ou SSTR5 isoladamente ¹²³, sugerindo que a ativação de ambos SSTR2 e SSTR5 induz um sinergismo funcional. A habilidade seletiva do antagonista do SSTR2 na inibição da secreção do GH quando ambos SSTR2 e SSTR5 são ativados pode indicar uma interrupção da interação funcional entre SSTR2 e SSTR5 ¹¹⁸. Outro trabalho com o análogo bi-específico e de alta afinidade, BIM-232440, também demonstrou uma inibição efetiva na secreção do GH *in vitro* e uma inibição na secreção da PRL nos tumores mistos ⁸¹. Ambos agonistas seletivos para o SSTR2 e SSTR5 suprimem a secreção do GH, porém apenas o agonista seletivo para o SSTR5 inibe a secreção da PRL, embora trabalhos com células fetais humanas de hipófise demonstraram a supressão da PRL mediada pelo SSTR2, e GH por SSTR2 e SSTR5 ^{111,123}.

Também encontramos maior expressão do SSTR1 em pacientes que normalizaram GH e IGF-I quando comparado com os que não normalizaram e também uma correlação positiva entre este subtipo e a porcentagem de redução tumoral. Ambos os achados não foram demonstradas na literatura *in vivo*. No entanto, o SSTR1 foi efetivo na supressão dos níveis de GH *in vitro* ^{124,125}. Zatelli e colaboradores demonstraram a primeira evidência, que o SSTR1 apresenta uma ativação seletiva *in vitro*, levando uma significativa redução hormonal do GH e IGF-I e na viabilidade celular, estando envolvido na redução da hipertensão e controle do aumento neoplásico. Porém o SSTR1 não se

correlacionou com os níveis do GH, PRL, imuno-histoquímica, idade e sexo ¹²⁵. Por outro lado um estudo com adenomas secretores de GH responsivos a SST *in vitro* que apresentaram expressão dos SSTR2, SSTR5 e alguns do SSTR1, demonstra que o SSTR1 não foi necessário para a resposta a SST na redução dos níveis do GH ¹²⁶. A confirmação dos nossos dados pode ser promissora para o desenvolvimento de novos AS com ação específica para o SSTR1 ou para o emprego do análogo universal pasireotídeo.

A diferença significativamente maior entre a expressão do SSTR3 quando se compara o grupo que apresentou redução tumoral maior que 25 % em relação ao que não apresentou, e a correlação positiva entre a expressão do SSTR3 e a porcentagem de redução tumoral pode ser explicada pelo fato do SSTR3 apresentar uma relação com a via de apoptose induzindo o p53 ^{52,56,62,83,127}.

Com efeito, uma publicação do nosso grupo descreve um paciente acromegálico com grande redução do volume tumoral, porém sem normalização do GH e IGF-I ao tratamento com AS, cuja análise do tumor curiosamente revelou expressão praticamente exclusiva do SSTR3 (paciente nº 12) ¹²⁸. Adicionalmente, uma descrição recente de paciente acromegálico portador de um adenoma densamente granulado secretor de GH também demonstrou a dissociação entre uma importante redução tumoral e a não resposta laboratorial ao OCT revelando alta expressão do SSTR5 quando comparados com outros subtipos de receptores ¹²⁹. Neste caso foi aventado o mecanismo inibidor do ciclo celular do SSTR5 como responsável pela

dissociação. Essa dissociação entre o efeito anti-secretório e anti-proliferativo descrita nas duas publicações mostram que os AS podem induzir a redução tumoral sem efeito na secreção do GH ¹²⁹. Estes dados já haviam sido observados por Danila e colaboradores ⁵⁶.

O SOM 230 (Pasireotideo, Novartis, Basel) é um análogo promissor em fase de estudo clínico, apresentando ação similar a SST ligando-se com alta afinidade aos quatro SSTR's (SSTR1, SSTR2, SSTR3 e SSTR5), mas com meia vida de 27 horas. Sua alta afinidade pelo SSTR1 e SSTR5 pode trazer grande importância clínica nos pacientes com adenomas secretores de GH resistentes aos AS convencionais ¹³⁰. Hofland e colaboradores observaram uma elevada resposta ao SOM230 em cultura de adenomas secretores de GH quando comparados com o OCT, sugerindo que o SOM230 poderá aumentar o número de pacientes acromegálicos controlados bioquimicamente, ambos via SSTR2 e SSTR5¹⁰³. Este mesmo grupo comparou *in vivo* a eficácia de uma única dose de SOM230 e OCT em doze acromegálicos. Ambas as drogas mostraram eficácias comparáveis em oito pacientes, sendo o SOM230 superior em três casos, e OCT obteve melhor resultado em um caso ⁴⁴.

Outra perspectiva terapêutica promissora é a combinação da SST e os agonistas de dopamina que demonstrou um aumento da supressão da secreção do GH. Rocheville e colaboradores mostraram que o receptor de dopamina, D2R e o receptor da SST, SSTR5 interagem fisicamente através da hetero-oligomerização criando um receptor análogo com aumento da atividade funcional ¹³¹. A associação direta intermembrana define um novo nível

molecular *crosstalk* entre subfamílias de receptores ligados à proteína G. Saveanu e colaboradores demonstraram que a molécula quimérica SST2-D2, BIM-23A387, tem um aumento potencial na supressão do GH de culturas responsivas ou parcialmente responsivas de adenomas de hipófise secretores de GH comparados aos análogos específicos SSTR2 e D2DR, ambos utilizados individualmente ou combinados ⁸¹. Desta forma, drogas baseadas nas moléculas quiméricas SST2-D2 ou SST2-SST5-D2 poderiam promover uma ferramenta adicional ao tratamento da acromegalia.

Esta variação na expressão dos SSTR's explica a heterogeneidade das respostas aos AS. Enquanto aqueles que não expressam receptores se mostrariam invariavelmente resistência ao tratamento.

O encontro da correlação positiva entre a expressão do RNAm e da proteína do SSTR2 é de grande importância, já que defeitos na tradução poderiam levar à não expressão da proteína. Ele confirma outras poucas publicações que exploraram este aspecto, geralmente avaliando somente o SSTR2, pelas dificuldades técnicas relacionadas ao anticorpo anti-SSTR5

6. CONCLUSÕES

A correlação positiva da expressão do RNAm e da proteína do SSTR2 com a resposta ao OCT-LAR confirma os dados na literatura de que este é o principal SSTR ativado pelo AS OCT. Adicionalmente a correlação positiva da expressão do SSTR1 com a redução dos níveis hormonais e SSTR1 e SSTR3 com redução tumoral e a alta prevalência da expressão do SSTR5 indicam que novos AS que possuam maior afinidade aos SSTR5, SSTR1 e SSTR3 poderiam otimizar o tratamento clínico em pacientes resistentes aos AS convencionais.

7. ANEXOS

Figura 1 – Ilustração esquemática dos SSTRs na membrana plasmática

Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de internalização do complexo agonista receptor acoplado a proteína G. Ref: Hofland LJ, Lamberts S The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev.* 2003;24:28-47

Tabela 1 – Características dos 39 pacientes estudados tais como: sexo, idade, imunohistoquímica do tumor e maior diâmetro tumoral

Número	Sexo	Idade	Imunohistoquímica	Maior Diâmetro (mm)
1	F	54	GH>50%; PRL 10-50%	15
2	M	42	GH>50%; PRL 10-50%	14
3	F	29	GH>50%; PRL 10-50%	32
4	F	58	GH>50%; PRL>50%	10
5	M	41	GH>50%; PRL>50%	10
6	M	35	GH>50%; PRL 10-50%; TSH<10%; FSH<10%	18
7	F	55	GH>50%; PRL>50%	11
8	M	57	GH>50%; PRL 10-50%	10
9	F	20	GH>50%; PRL>50%	9
10	F	53	GH>50%; PRL>50%	15
11	F	32	GH>50%; PRL 10-50%; TSH<10%; FSH<10%	14
12	M	24	GH>50%	20
13	F	45	GH>50%; PRL 10-50%	10
14	M	28	GH>50%; PRL>50%; TSH<10%	15
15	F	65	GH>50%; PRL 10-50%	14
16	F	24	GH>50%	10
17	M	62	GH>50%; PRL 10-50%	10
18	M	39	GH>50%; PRL>50%; TSH<10%; FSH<10%; LH<10%	10
19	F	44	GH>50%; PRL 10-50%	15
20	M	52	GH>50%; PRL>50%; TSH<10%; FSH<10%	20
21	F	46	GH>50%; PRL>50%; TSH<10%; FSH<10%; LH<10%	10
22	M	43	GH>50%; PRL 10-50%	23
23	M	43	GH>50%	8
24	M	50	GH>50%	20
25	F	26	GH>50%; PRL 10-50%	10
26	F	56	GH>50%	14
27	F	42	GH>50%	20
28	F	35	GH>50%	50
29	F	51	GH<10%; PRL<10%	30
30	F	76	GH>50%	15

(continuação)

Tabela 1 – Características dos 39 pacientes estudados tais como: sexo, idade, imunohistoquímica do tumor e maior diâmetro tumoral

Número	Sexo	Idade	Imunohistoquímica	Maior Diâmetro (mm)
31	F	34	GH>50%; PRL 10-50%	70
32	F	44	GH<10%; PRL<10%	23
33	F	46	GH>50%; PRL>50%; TSH<10%; FSH<10%; LH<10%	6
34	F	40	GH>50%; PRL>50%	30
35	M	44	GH>50%; PRL>50%; TSH<10%; FSH<10%; LH<10%	21
36	M	38	GH 10-50%	45
37	M	14	GH>50%	20
38	F	43	GH>50%; PRL 10-50%	50
39	M	39	GH>50%; TSH<10%; FSH<10%	45

(conclusão)

Tabela 2 - Intervalo de tempo entre a retirada do fragmento tumoral durante o processo cirúrgico e a extração do RNA

Número	Tempo de extração RNA (dias)	Número	Tempo de extração RNA (dias)
1	1	21	6
2	1	22	2109
3	1	23	1
4	1	24	1
5	1	25	1698
6	1	26	2306
7	1	27	1
8	1	28	1
9	1	29	1516
10	170	30	1
11	1	31	2159
12	307	32	1581
13	1	33	1
14	1	34	2213
15	2104	35	2293
16	1844	36	2286
17	1	37	1
18	1	38	1
19	1	39	1
20	1727		

Tabela 3 – Sequências dos primers dos SSTRs e GAPDH obtidos através do auxílio do programa primer 3. (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)

	Sense	Anti-sense
SSTR 1	5' TAT CTG CCT GTG CTA CGT GC 3'	5' GAT GAC CGA CAG CTG ACT CA 3'
SSTR 2	5' ATG CCA AGA TGA AGA CCA TCA C 3'	5' TGA ACT GAT TGA TGC CAT CCA 3'
SSTR 3	5' CTG GGT AAC TCG CTG GTC ATC TA 3'	5' AGC GCC AGG TTG AGG ATG TA 3'
SSTR 4	5' CTT CTG TCT CAC CGT GCT CA 3'	5' GTC TGG TGT CTG CGA AGA TG 3'
SSTR 5	5' CGT CTT CAT CAT CTA CAC GG 3'	5' GGC CAG GTT GAC GAT GTT GA 3'
GAPDH	5' GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT 3'	5' TGA GGA GGG GAG ATT CAG TG 3'

Figura 3 – Bloco de TMA constituído de cilindros de 0,6 mm de diâmetro com 0,4 mm de diferença entre um cilindro e outro com 11 linhas e 11 colunas

Tabela 4 – Classificação dos cilindros de acordo com a análise das perdas

Classificação	Descrição
p0	cilindro intacto, sem qualquer perda
p1	perda de 1 a 25% da área da posição
p2	perda de 26 a 30% da área da posição
p3	perda de 51 a 75% da área da posição
p4	perda de mais de 75 % da área da posição

Tabela 5 – Classificação dos cilindros em escalas semi-quantitativas de acordo com a positividade membranosa das células

Classificação	Descrição
0	negativo
F	positividade focal em até 5% das células
1+	positividade entre 6 a 25% das células
2+	positividade entre 26 a 50% das células
3+	positividade entre 51 a 75% das células
4+	positividade entre 76 a 100% das células

Tabela 6 - Classificação da positividade dos cilindros de acordo com a completude

Classificação	Descrição
I	a membrana plasmática da célula apresenta-se incompletamente marcada
c	a membrana plasmática da célula apresenta todo seu contorno completamente marcado
i/c	um misto de áreas i com áreas c, sendo então oferecido o percentual relativo entre as duas

Tabela 7 - Classificação da positividade dos cilindros de acordo com a intensidade

Classificação	Descrição
i0	ausência de positividade
i1	intensidade de marcação leve
i2	intensidade de marcação moderada
i3	intensidade de marcação forte

Figura 4 – Curva de *melting* dos genes SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, SSTR5 e GAPDH em duplicatas

Figura 5 – Curva com diluições seriadas de RNAm proveniente de um pool de tecido hipofisário normal realizada em triplicata com o gene GAPDH

Figura 6 - Gráfico da eficiência de amplificação do gene SSTR2 e o controle interno (GAPDH)

Tabela 8 - Expressão do RNAm dos SSTRs nos tumores dos pacientes analisados por real time RT-PCR através do método $2^{-\Delta Ct}$

Paciente	SSTR 1	SSTR 2	SSTR 3	SSTR 4	SSTR 5
1	0,24	0,28	1,35	0,04	7,86
2	0,02	1,94	0,16	0,01	1,70
3	0,10	0,10	0,13	0,03	7,11
4	0,09	0,55	3,57	0,00	7,14
5	0,10	0,17	1,77	0,02	8,08
6	0,10	0,60	3,90	0,04	2,40
7	0,05	0,21	3,81	0,00	2,68
8	0,20	2,50	3,20	0,00	5,80
9	0,14	2,80	5,90	0,00	6,90
10	0,30	0,93	1,07	0,00	0,56
11	0,21	0,48	4,12	0,04	22,20
12	0,00	0,03	7,08	0,00	0,08
13	0,50	4,77	8,19	0,00	5,44
14	0,50	0,16	0,97	0,04	5,53
15	0,11	0,90	4,90	0,03	6,50
16	0,13	0,04	1,87	0,00	9,93
17	0,00	1,71	2,67	0,00	1,04
18	0,07	0,19	4,46	0,00	17,58
19	0,01	0,06	14,32	0,00	0,28
20	0,07	4,07	0,77	0,00	7,78
21	0,02	0,11	1,22	0,03	3,87
22	0,57	3,25	0,89	0,02	3,29
23	3,58	4,37	4,49	0,02	3,32
24	0,11	0,01	0,21	0,00	1,56
25	0,01	0,48	1,44	0,00	6,11
26	2,30	1,41	1,50	0,02	8,69
27	7,06	4,69	3,30	0,01	2,78
28	0,01	0,04	0,99	0,00	0,79
29	0,00	1,21	12,45	0,00	12,47
30	0,01	0,08	1,13	0,00	2,05
31	0,04	0,57	1,26	0,00	5,90

(continuação)

Tabela 8 - Expressão do RNAm dos SSTRs nos tumores dos pacientes analisados por real time RT-PCR através do método $2^{-\Delta Ct}$

Paciente	SSTR 1	SSTR 2	SSTR 3	SSTR 4	SSTR 5
32	0,02	2,90	2,83	0,0	4,17
33	0,44	9,17	0,11	0,00	1,35
34	0,01	0,07	0,76	0,00	2,00
37	0,00	0,45	0,06	0,00	0,58
38	0,06	0,03	5,93	0,00	32,21
39	0,09	1,38	2,78	0,00	12,66

(conclusão)

Figura 7 – Mediana da expressão dos SSTRs nos 39 fragmentos tumorais estudados

Figura 8 – Expressão do SSTR1 nos 39 fragmentos tumorais estudados

Figura 9 - Expressão do SSTR2 nos 39 fragmentos tumorais estudados

Figura 10 - Expressão do SSTR3 nos 39 fragmentos tumorais estudados

Figura 11 - Expressão do SSTR5 nos 39 fragmentos tumorais estudados

Figura 12 - Correlação positiva entre níveis GH Pré-cirúrgico e o maior diâmetro tumoral

Figura 13 - Correlação negativa entre o maior diâmetro tumoral e a idade

Figura 14 - Mediana da expressão dos secretores GH e GH-PRL. Sendo o SSTR2 mais expresso nos tumores secretores de GH-PRL

Figura 15 - Mediana da expressão dos pacientes menores e maiores de 40 anos.

Sendo o SSTR2 mais expresso nos pacientes maiores de 40 anos

Figura 16 – Mediana da expressão dos SSTRs nos 19 fragmentos tumorais que realizaram tratamento com OCT-LAR

Figura 17 - Expressão do SSTR1 nos 19 fragmentos tumorais estudados que realizaram tratamento com OCT-LAR.

Figura 18 - Expressão do SSTR2 nos 19 fragmentos tumorais que realizaram tratamento com OCT-LAR

Figura 19 - Expressão do SSTR3 nos 19 fragmentos tumorais que realizaram tratamento com OCT-LAR

Figura 20 - Expressão do SSTR5 nos 19 fragmentos tumorais que realizaram tratamento com OCT-LAR

Figura 21 – Mediana da expressão dos SSTRs nos 13 fragmentos tumorais que realizaram tratamento primário com OCT-LAR

Figura 22 - Expressão do SSTR1 nos 13 fragmentos tumorais estudados que realizaram tratamento primário com OCT-LAR

Figura 23 - Expressão do SSTR2 nos 13 fragmentos tumorais que realizaram tratamento primário com OCT-LAR

Figura 24 - Expressão do SSTR3 nos 13 fragmentos tumorais que realizaram tratamento primário com OCT-LAR

Figura 25 - Expressão do SSTR5 nos 13 fragmentos tumorais que realizaram tratamento primário com OCT-LAR

Tabela 9 – Características dos 19 pacientes estudados que realizaram tratamento com OCT-LAR tais como: sexo, idade, % ULNR IGF-I pré cirúrgico; % ULNR IGF-I pré OCT-LAR; % ULNR IGF-I pós OCT-LAR; GH pré cirúrgico; GH pré OCT-LAR; GH pós OCT-LAR e tempo de tratamento com OCT-LAR em meses

Paciente	Sexo	Idade	IGF-I Pré-C ULNR%	GH Pré-C	IGF-I Pré-LAR ULNR%	GH Pré- LAR	IGF-I Pós-LAR ULNR%	GH Pós- LAR	Trata- mento (meses)
1	F	54	902	55,7	602	1832	902	55,7	18
2	M	42	146	2,9	174	483	63	0,3	11
3	F	29	352	109,4	173	1768	601	109,4	16
4	F	58	325	3,1	1125	660	228	3,1	21
5	M	41	269	1,1	132	127	46	1,1	10
6	M	35	370	5,1	362	1163	370	5,1	23
7	F	55	185	1,8	157	376	99	1,8	27
8	M	57	275	0,2	492	241	67	0,2	68
9	F	20	205	2,5	80	480	62	2,5	25
10	F	53	96	0,6	541	248	48	1,1	31
11	F	32	288	0,1	402	238	48	0,1	40
12	M	24	175	3,1	607	769	180	3,1	5
13	F	45	575	0,5	409	98	27	0,5	33
14	M	28	513	6,6	435	3	93	1,3	14
15	F	65	313	1,3	181	191	69	1,5	71
16	F	24	133	12,8	179	1083	294	12,8	50
17	M	62	113	96	1132	1592	549	96	9
18	M	39	504	4,1	396	998	318	4,1	16
19	F	44	293	25,3	271	1539	556	25,3	24

Figura 26 – Mediana de expressão do SSTR1 nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I e não normalizaram. Sendo mais expresso nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I

Figura 27 – Mediana de expressão do SSTR1 nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I e não normalizaram. Sendo mais expresso nos pacientes que normalizaram GH e IGF-I

Tabela 10 – Pacientes que realizaram tratamento primário com OCT-LAR e sua respectiva porcentagem de redução tumoral

Paciente	% Redução Tumoral	Maior Diâmetro Pré OCT-LAR (mm)	Maior Diâmetro Pós OCT-LAR (mm)
1	16	15	13
2	10	14	13
3	14	32	28
4	20	10	8
5	44	10	6
6	31	18	12
7	59	11	5
8	97	10	<1
9	72	9	3
10	47	15	8
11	67	14	5
12	75	20	5
13	61	10	4

Figura 28 – Mediana de expressão do SSTR3 nos pacientes que apresentam redução tumoral e não apresentaram. Sendo mais expresso nos pacientes que apresentaram redução tumoral

Figura 29 – Correlação positiva com a expressão do SSTR1 e a porcentagem de redução tumoral

Figura 30 – Correlação positiva entre a expressão do SSTR2 e a porcentagem de redução tumoral

Figura 31 – Correlação positiva entre a porcentagem de redução tumoral e a expressão do RNAm do SSTR3

Figura 32 - Correlação positiva entre o tempo de tratamento e a porcentagem de redução tumoral

Figura 33 – Foto ilustrativa da imuno-histoquímica do SSTR2

Tabela 11 - Descrição dos pacientes perdidos na avaliação de expressão de SSTR2 por imuno-histoquímica em TMA, e descrição dos pacientes com duas espécimes

Casos perdidos	Casos com dois espécimes
1	3
12	16
18	31
21	34
26	36
32	

Tabela 12 - Descrição por classes de positividade para a imuno-expressão do
SSTR2 (n=31)

Imuno-expressão membranosa	N	Intensidade	Subtotais %
0	12	i0	38,7
F	9	i1	45,1
	5	i2	
1+	1	i1	6,5
	1	i2	
2+	1	i1	3,2
3+	1	i1	6,5
	1	i2	
4+	0		0
Total	31	100,0	100,0

Tabela 13 - Descrição individual da imuno-expressão do SSTR2 (n=31)

Paciente	Positividade de membrana	Compleitude	Intensidade
5	F	i	2
6	F	i	1
7	F	i	1
7	F	i	1
8	F	i	1
9	F	i	1
10	F	i	2
11	F	i	1
13	1	i	2
14	F	i	1
17	2	i/c (90%/10%)	1
19	F	i	2
23	F	i	2
23	F	i	1
25	F	i	1
28	1	i	1
33	3	i/c (80%/20%)	2
38	F	i	2
39	3	i	1

Tabela 14 - Expressão do RNAm do SSTR2 pelo método $2^{-\Delta Ct}$ por real time RT-PCR e imuno-expressão da proteína do SSTR2 por imuno-histoquímica, bem como a positividade da membrana, completude e intensidade

Paciente	RNAm SSTR 2	IHC SSTR2	Positividade membrana	Completude	Intensidade
2	1,94	+	f	i	1
3	0,10	-	0	0	0
4	0,55	-	0	0	0
5	0,17	+	f	i	2
6	0,60	+	f	i	1
7	0,21	+	f	i	1
8	2,50	+	f	i	1
9	2,80	+	f	i	1
10	0,93	+	f	i	2
11	0,48	+	f	i	1
13	4,77	+	1	i	2
14	0,16	+	f	i	1
15	0,90	-	0	0	0
16	0,04	-	0	0	0
17	1,71	+	2	i/c (90%/10%)	1
19	0,06	+	f	i	2
22	3,25	+	f	i	1
23	4,37	+	f	i	2
24	0,01	-	0	0	0
25	0,48	+	f	i	1
28	0,04	+	1	i	1
29	1,21	-	0	0	0
30	0,08	-	0	0	0
31	0,57	-	0	0	0
33	9,17	+	3	i/c (80%/20%)	2
34	0,07	-	0	0	0
35	0,13	-	0	0	0
36	0,04	-	0	0	0
38	0,03	+	f	i	2
39	1,38	+	3	i	1

Figura 34 – Correlação positiva entre a positividade da membrana da imunexpressão da proteína e do RNAm do SSTR2

Figura 35 – Correlação positiva entre a completude da imuno-expressão da proteína e do RNAm do SSTR2

Figura 37 – Correlação positiva entre a positividade da membrana na IHC da proteína do SSTR2 e a expressão do RNAm do SSTR2 nos pacientes que realizaram tratamento primário com OCT-LAR

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Melmed S, Jackson I, Kleinberg D, Klibanski A. Current treatment guidelines for acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2646-52.
2. Melmed S, Kleinberg D. Anterior Pituitary. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, and Polonsky KS, editores. *Williams Textbook of Endocrinology*, 10th ed., WB Saunders Company, Philadelphia, PA, 2003, pp. 382-617.
3. Li J, Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E and Smyth HS. Growth hormone (GH) and prolactin (PRL) gene expression and immunoreactivity in GH- and PRL-producing human pituitary adenomas. *Springer Berlin.* 1993;422(3):193-201.
4. Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam HM, Sano T, Yoshimoto K. The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol.* 2007;66(4):499-502.
5. Drange MR, Fram NR, Herman-Bornet V, Melmed S. Pituitary tumor registry: a novel clinical resource. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:168-174.
6. Giustina A, Barkan A, Casnueva FF, et al. Criteria for cure in acromegaly: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:526-9.

7. Bengtsson BA, Éden S, Ernest I, Oden A, Sjogren B. Epidemiology of acromegaly and long-term survival in a study of 166 cases diagnosed between 1955 and 1984. *Acta Med Scand*. 1988;223:327-35.
8. Barkan AI. Acromegaly: diagnosis and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1989;18:277-310.
9. Melmed S, Herman-Bonert V. Diagnóstico e tratamento da acromegalia. In: Vilar L et al. *Endocrinologia Clínica* 2º ed., Rio de Janeiro: MEDSI 45-67, 2001.
10. Bates AS, Hoff V, Jones JM, Clayton RN. Does treatment of acromegaly alter life expectancy? *Metabolism*. 1995;44:1-5.
11. Beuschlein F, Strasburger CJ, Siegerstetter V, Moradpour D, Lichter P, Bidlingmaier M, Blum HE, Reincke M. Acromegaly caused by secretion of growth hormone by a non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Méd*. 2000;342:1871-6.
12. Strowski M, Kohler M, Chen H, Trumbauer ME, Li Z, Szalkowski D, Gopal-Truter S, Fisher JK, Schaeffer JM, Blake AD, Zhang BB, Wilkinson HA. Somatostatin receptor subtype 5 regulates insulin secretion and glucose homeostasis. *Mol Endocrinol*. 2000;342:1171-7.
13. Boguszewski CL. O laboratório no diagnóstico e seguimento da acromegalia. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(1):34-44.
14. Swearingen B, Barker FG 2nd, Katznelson L, Biller BM, Grinspoon S, Klibanski A, Moayeri N, Black PM, Zervas NT. Long-term mortality after

- transsphenoidal surgery and adjunctive therapy for acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(10):3419-26.
15. Hardy J. Secreting pituitary microadenomas. *Rev Otoneuroophthalmol.* 1974;46(4):347-54.
 16. Ahmed S, Elsheikh M, Page RCL, Adams CBT, Wass JAH. Outcome of Transsphenoidal surgery for acromegaly and its relationship to surgical experience. *Clin Endocrinol.* 1999;50:561-7.
 17. Lombardi G, Colao AM, Ferone D, Sarnacchiaro F, Marzullo P, Di Sarno A, E Rossi, B Merola. CV 205-502 treatment in therapy-resistant acromegalic patients. *Eur J Endocrinol Metab.* 1995;132:559-64.
 18. Nomikos P, Buchfelder M, Fahlbush R. The outcome of surgery in 668 patients with acromegaly using current criteria of biochemical "cure". *Eur J Endocrinol.* 2005;152(3):379-87.
 19. Barkan AL, Halasz L, Dornfeld KJ, Jaffe CA, Friberg RD, Chandler WF, Sandler HM, Van Der Lely AJ, De Herder WW, Lamberts SWJ. Pituitary irradiation is ineffective in normalizing plasma insulin like growth factor 1 in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82: 3187-91.
 20. Jallad RS, Musolino NR, Salgado LR, Bronstein MD. Treatment of acromegaly: is there still a place for radiotherapy? *Pituitary.* 2007;10(1):53-9.
 21. Zhang N, Pan L, Wang EM, Dai JZ, Wang BJ, Cai PW. Radiosurgery for growth hormone producing pituitary adenomas. *J Neurosurg.* 2000; 6-9.

22. Castenelli F, Morage I, Dufour H, Regis J, Brue T. Radiotherapy and radiosurgery in acromegaly. *Pituitary*. 2008; jan4.
23. Colao A, Ferone D, Marzullo P, Di Sarno A, Cerbone G, Sarnacchiaro F, Cirillo S, Merola B, Lombardi G. Effects of different dopaminergic agents in treatment of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:518-23.
24. Cozzi R, Attanasio R, Barausse M, Dallabonzana D, Orlandi P, Da Re N, Branca V, Oppizzi G, Gelli D. Cabergoline in acromegaly: a renewed role for dopamine agonist treatment. *Eur J Endocrinol*. 1998;139:516-21.
25. Ferrari C, Paracchi A, Romano C, Gerevini G, Boghen M, Barreca A, Fortini P, Dubini A. Long-lasting lowering of serum growth hormone and prolactin by single and repetitive cabergoline administration in dopamine responsive acromegalic patients. *Clin Endocrinol*. 1988;29:467-76.
26. Jackson SNJ, Fowler J, Howlett TA. Cabergoline treatment of acromegaly: a preliminary dose finding study. *Clin Endocrinol*. 1997;46:745-9.
27. Jaquet P. Evidence for dopamine agonists in the treatment of acromegaly. *J. Endocrinol*. 1997;155:59-60.
28. Marzullo P, Ferrone D, Di Somma C, Pivonello R, Filippella M, Lombardi G, Colao A. Efficacy of combined treatment with lanreotide and cabergoline in selected therapy-resistant acromegalic patients. *Pituitary*. 1999;1:115-20.
29. Muratori M, Arosio M, Gambino GC, et al. Use of cabergoline in long term treatment of hyperprolactinemic and acromegalic patients. *J Endocrinol Invest*. 1997;20:537-46.

30. Newman CB. Medical therapy for acromegaly. *Endocrinol Clin of North Am.* 1999; 28:171-90.
31. Trainer PJ, Drake WM, Katznelson L, Freda PU, Herman-Bonert V, Van der Lely AJ, Dimaraki EV, Stewart PM, Friend KE, Vance ML, Besser GM, Scarlett D, Scarlett JA. Treatment of acromegaly with the growth hormone – receptor antagonist pegvisomant. *N Engl J Méd.* 2000;342:1171-7.
32. Musolino NRC. Tumores hipofisários: opções terapêuticas atuais e perspectivas atuais e perspectivas futuras de tratamento. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(4):482-91.
33. Colao A, Ferone D, Cappabianca P, De Caro MLB, Marzullo P, Monticelli A, Alfieri A, Merola B, Caill A, Divitiis E, Lombardi G. Effect of octreotide pretreatment on surgical outcome in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 82:3308-14.
34. Colao A, Marzullo P, Ferone D, Spinelli L, Cuocolo A, Bonaduce D, Salvatore M, Boerlin V, Lancranjan I, Lombardi G. Cardiovascular effects of depot long acting somatostatin analog Sandostatin LAR in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3132-40.
35. Lamberts SWJ, Lely V, Hofland LJ. New somatostatin analogs: will they fulfil old promises? *Eur J Endocrinol.* 2002;146:701-5.
36. Amato G, Mazziotti G, Rotondi M, Iorio S, Doga M, Sorvillo F, Manganella G, Di Salle F, Giustina A, Carella C. Long-term effects of lanreotide SR and octreotide LAR on tumor shrinkage and GH hypersecretion in patients

with previously untreated acromegaly. *Clinical Endocrinology (Oxford)*. 2002;56:65-71.

37. Freda PU. How effective are current therapies for acromegaly? *Growth hormone & IGF Research*. 2003;13:S144-51.
38. Jallad RS, Musolino NR, Kodaira S, Cescato VA, Bronstein MD. Does partial surgical tumor removal influence the response to octreotide-LAR in acromegalic patients previously resistant to the somatostatin analogue? *Clin Endocrinol*. 2007;67(2):310-5.
39. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypotlamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*. 1973;170:77-9.
40. Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Méd*. 1983;309:1495-1501.
41. Reichlin S. Somatostatin (second of two parts). *N Engl J Méd*. 1983;309:1556-63.
42. Epelbaum J. Somatostatin in the central nervous system:physiology and pathological modification. *Prog Neurobiol*, 1986;27:63-100.
43. Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr Rev*, 1991;12:450–82.
44. Schally AV. Oncological applications of somatostatin analogues. *Cancer Res*. 1988;48:6977–85.

45. Krantic S, Goddard I, Saveanu A, Giannetti N, Fombonne J, Cardoso A, Jaquet P, Enjalbert A. Review: Novel modalities of somatostatin actions. *Eur J Endocrinol*. 2004;151:643-55.
46. Naylor SL, Sakaguchi AY, Shen LP, Bell GI, Rutter TB. Shows, polymorphic human somatostatin gene is located on chromosome 3. *Proc Natl Acad Sci*. 1983;80:2686-9.
47. Stoller, TJ, Shields D. Retrovirus-mediated expression of preprosomatostatin: posttranslational processing, intracellular storage, and secretion in GH3 pituitary cells. *J Cell Biol*. 1988;107:2087-95.
48. Schonbrunn A, Tashjian Jr H. Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J. Biol. Chem*. 1978;253(18):6473-83.
49. Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ. Review: Somatostatin receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1616:1-84.
50. Reisine T, Bell G. Molecular Biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev*. 1995;16:427-42.
51. Dhanasekaran N, Heasley LE, Johnson GL. G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. *Endocr Rev*. 1995;16:259-70.
52. Hofland LJ, Lamberts S. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev*. 2003;24:28-47.

53. Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimarães RFC, Marcondes JB, Chimelli LMC, Fontes R, Mata PJP, Niemeyer Filho P, Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:65-74.
54. Ballarè E, Persani L, Lania AG, et al. Mutation of somatostatin receptor type 5 in an acromegalic patient resistant to somatostatin analog treatment. *Clin Endocrinol Metab.* 2001;82:3809-14.
55. Barlier A, Boullier LP, Gunz G, Zamora AJ, Jaquet P, Enjalbert A. Impact of gsp oncogene on expression of genes coding for Gsa, Pit-1, Gi2a, and somatostatin receptor 2 in human somatotroph adenomas: involvement in octreotide sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2759-65.
56. Danila DC, Haidar JNS, Zhang X, Katznelson L, Culler MD, Klibanski A. Somatostatin receptor-specific analogs: Effects on cell proliferation and growth hormone secretion in human somatotroph tumors. *Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2976-81.
57. Elberg G, Hipkin W, Schonbrunn A. Homologous and heterologous regulation of somatostatin receptor 2. *Mol endocrinol.* 2002;16:2502-14.
58. 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;84:724-9.

59. Teijeiro R, Rios R, Costoya J, Castro R, Bello J, Devesa J, Arce V. Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. *Cell Physiology and Biochemistry*. 2002;12:31–8.
60. Buscail L, Delesque N, Este`ve JP, Saint-Laurent N, Prats H, Clerc P, Robberecht P, Bell GI, Liebow C, Schally A, Vaysse N, Susini C. Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91:2315–9.
61. Buscail L, Este`ve JP, Saint-Laurent N, Bertrand V, Reisine T, O'Carroll AM, Bell GI, Schally A, Vaysse N, Susini C. Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtype SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92:1580–4.
62. Csaba Z, Dournaud P. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* 2001; 35:1-23.
63. Koenig JA, Edwardson JM. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1997;18:276–87.
64. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB*. 1990;J4:2881–9.
65. Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996;74:1095–110.

66. Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP. β -adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 1993;268:337–41.
67. Patel YC, Greenwood M, Kent G, Panetta R, Srikant CB. Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and camp regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192(1):288-94.
68. Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trend Pharmacol Sci.* 1995;16:86-8.
69. Freda PU, Katznelson L, van der Lely AJ, Reyes CM, Zhao S, Rabinowitz D. Long-acting somatostatin analog therapy of acromegaly: a meta-analysis. Long-acting somatostatin analog therapy of acromegaly: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:4465-73.
70. Jallad RS, Musolino NR, Salgado LR, Bronstein MD. Treatment of acromegaly with octreotide-LAR: extensive experience in a Brazilian institution. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;63:168-75.
71. Bronstein M, Musolino N, Jallad R, Cendros JM, Ramis J, Obach R, Leselbaum A, Catus F. Pharmacokinetic profile of lanreotide Autogel in patients with acromegaly after four deep subcutaneous injections of 60, 90 or 120 mg every 28 days. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63:514-9.

72. Freda PU. Clinical Review 150: Somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(7):3013-8.
73. Cannavò S, Squadrito S, Curtò L, Almoto B, Vieni A, Trimarchi F. Results of a two-year treatment with slow release lanreotide in acromegaly. *Horm Metab Res.* 2000; 32(6):224-9.
74. Lamberts SW. The role of somatostatin in the regulation of anterior pituitary hormone secretion and the use of its analogs in the treatment of human pituitary tumors. *Endocr Rev.* 1988;9:417–36.
75. Davies PH, Stewart SE, Lancranjan L, Sheppard MC, Stewart PM. Long-term therapy with long-acting octreotide (Sandostatin-LAR) for the management of acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998;48:311–6.
76. Flogstad AK, Halse J, Bakke S, Lancranjan I, Marbach P, Bruns C, Jervell J. Sandostatin LAR in acromegalic patients: long-term treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:23–8.
77. Caron P, Morange-Ramos I, Cogne M, Jaquet P. Three year follow-up of acromegalic patients treated with intramuscular slow-release lanreotide. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:18–22.
78. Haraguchi K, Ohtaka M, Takazawa K, Endo T, Onaya T. Desensitization to somatostatin analogue (octreotide) observed in a patient with acromegaly. *Endocr J.* 1995;42:295–300.
79. Petersenn S, Heynes M, Ludecke DK, Beil FU, Schulte HM. Absence of somatostatin receptor type 2A mutation and Gip oncogene in pituitary somatotroph adenomas. *Clin Endocrinol.* 2000;52:35-42.

80. Petersenn S, Rasch AC, Bonhke, Shulte HM. Identification of an upstream pituitary-active promoter of human somatostatin receptor subtype 5. *Endocrinol.* 2002;143:2626-34.
81. Saveanu A, Gunz G, Dufour H, et al. BIM-23244, a somatostatin receptor subtype 2 and 5 – selective analog with enhanced efficacy in suppressing growth hormone (GH) from octreotide – resistant human GH secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:140-5.
82. Saveanu A, Lavaque E, Gunz G, Barlier A, Kim S, Taylor JE, Culler MD, Enjalbert A, Jaquet P. Demonstration of enhanced potency of a chimeric somatostatin – dopamine molecule, BIM-23 A 387, in suppressing growth hormone and prolactin secretion from human pituitary somatotroph adenomas cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5545-52.
83. Jaquet P, Saveanu A., Gunz G., et al. Human somatostatin receptors subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify distinct tumoral phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 781-792, 2000.
84. Lamberts SW, Lely AJVL, Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med.* 1996;334:246-54.
85. Thodou E, Kontogeorgos G, Theodossiou D and Pateraki M. Mapping of somatostatin receptor types in GH or/and PRL producing pituitary adenomas. *Journal of Clinical Pathology.* 2006;59:274-279.
86. James RA, Sarapura VD, Bruns C, Raulf F, Dowing JM, Gordon DF et al. Thyroid hormone induced expression of specific somatostatin receptor

subtypes correlates with involution of the TtT-97 murine thyrotrope tumor. *Endocrinology*. 1997;138:719-24.

87. Baumeister H, Meyerhof W. Gene regulation of somatostatin receptors in rats. *J Physiol Paris*. 2000;42:527-552.
88. Xu Y, Berelowitz M, Bruno JF. Dexamethasone regulates somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in rat pituitary GH4C1 cells. *Endocrinology*. 1995;136:5070-5.
89. Van der Hoek J, de Herder WW, Feelders RA, Van der Lely AJ, Uitterlinden P, Boerlin V, Bruns C, Poon KW, Lewis I, Weckbecker G, Krahne T, Hofland LJ, Lamberts SW. A single-dose comparison of the acute effects between the new somatostatin analog SOM230 and octreotide in acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:638-45.
90. Chirgwin JM, Przybyla AE, Macdonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochem*. 1979;18:5294-9.
91. Mattheus N, Ekramoddoullah AK, Lee SP. Isolation of high-quality RNA from white spruce tissue using a three-stage purification method and subsequent cloning of a transcript from the PR-10 gene family. *Phytochem Anal*. 2003;14(4):209-15.
92. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, and Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21:389–95.

93. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers (capítulo 20). In: Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology, v. 132, Totowa, New Jersey, Human press. P. 365-386, 2000.
94. Ginzinger, DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 2002;30:503-12.
95. Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M, Fleischmann A, Altermatt HJ, Jaggi R. Realible gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Inv.* 2005;85(8):1040-50.
96. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Miguell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology.* 2003;1472-6750:3-18.
97. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallionimeni OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Méd.* 1998;4:844–7.
98. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1966–75.

99. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000;80:1943–9.
100. Simon R, Nocito A, Hubscher T, et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:1141–6.
101. Lamberts SW, Lely AJVL, Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med*. 1996;334:246-54.
102. Florio T, Thellung S, Corsaro A, Bocca L, Arena S, Pattarozzi A, Villa V, Massa A, Diana F, Schettini D, Barbieri F, Ravetti JL, Spaziante ;r, Giusti M, Schettini G. 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*. 2003;59:115-28.
103. Hofland LJ, Hoek JVD, Koetsveld PMV, Herder WW, Waaijers M, Sprij-Mooij D, Bruns C, Weckebecker, Feelders R, Lely AJVD, Beckers A and Lamberts SWJ. 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(4):1577-85.
104. Park C, Yang I, Woo J, Kim S, Kim J, Kim Y, Sohn S, Kim E, Lee M, Park H, Jung J, Park S. Somatostatin (SRIF) receptor subtype 2 and 5 gene expression in growth hormone-secreting pituitary adenomas: The relationship with endogenous SRIF activity and response to Octreotide. *Endocr J*. 2004;51(2):227-36.

105. Lissett CA, Shalet SM. Management of pituitary tumours: strategy for investigation and follow-up. *Horm Res.* 2000;53(3):65-70.
106. Colao A, Ferone D, Marzullo P, Lombardi G. Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management. *Endocr Rev.* 2004;25:102-52.
107. Etxabe J, Gaztambide S, Latorre P, Vazquez JA. Acromegaly: an epidemiological study. *J Endocrinol Invest.* 1993;16:181-7.
108. Saeger W, Lüdecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ, Petersenn S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol.* 2007;156(2):203-16.
109. Yang IM, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Choi YK. Characteristics of acromegalic patients with good response to octreotide, a somatostatin analogue. *Clin Endocrinol.* 1995;42(3):295-301.
110. Cap J, Marekova M, Cerman J, Malirova E, Suba P, Netuka D, Hana V, Marek J. Inhibition of hormone secretion in GH-secreting pituitary adenomas by receptor-subtype specific somatostatin analogues in vitro. *Cap Gen Physiol Biophys.* 2003;22:201-12.
111. Shimon I, Yan X, Taylor JE, Weiss MH, Culler MD, Melmed S. Somatostatin receptor (SSTR) subtype-selective analogs differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. *J Clin Invest.* 1997;100:2386 –92.

112. Van Der Lely AJ, Harris AG and Lamberts SW. The sensitivity of growth hormone secretion to medical treatment in acromegalic patients: influence of age and sex. *Clinical Endocrinology*, 1992; 37:181-5.
113. Jaquet P, Saveanu A, Gunz G, et al. 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; 85:781–92.
114. Jaquet P, Gunz G, Saveanu A, Dufour H, Taylor J, Dong J, Kim S, Moreau JP, Enjalbert A, Culler MD. Efficacy of chimeric molecules directed towards multiple somatostatin and dopamine receptors on inhibition of GH and prolactin secretion from GH-secreting pituitary adenomas classified as partially responsive to somatostatin analog therapy. *Eur J Endocrinol*. 2005;153:135-141.
115. Hofland LJ, Lamberts SW. Somatostatin receptors in pituitary function, diagnosis and therapy. *Front Horm Res*. 2004; 32:235-52.
116. Barlier A, Pellegrini-Bouiller I, Gunz G, Zamora AJ, Jaquet P, Enjalbert A. Impact of gsp oncogene on the expression of genes coding for Gsa, Pit-1, Gi2a, and somatostatin receptor 2 in human somatotroph adenomas: involvement in octreotide sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. . 1999;84;2759 –65.
117. Fougner SL, Borota OC, Berg JP, Hald JK, Ramm-Pettersen J and Bollerslev J. The clinical response to somatostatin analogues in

- acromegaly correlates to the somatostatin receptor subtype 2a protein expression of the adenoma. *Clin Endocrinol*. 2008;68:458-65.
118. Ren SG, Taylor J, Dong J, Yu R, Culler MD, Melmed S. Functional association of somatostatin receptor subtype 2 and 5 in inhibiting human growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(9):4239-45.
 119. Bronstein MD. Acromegaly: molecular expression of somatostatin receptor subtypes and treatment outcome. *Front Horm Res*. 2006;35:129-34.
 120. Newman CB, Melmed S, George A, et al. Octreotide as primary therapy for acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:3034-40.
 121. Bevan JS. The antitumoral effects of somatostatin analog therapy in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:1856-63.
 122. Cozzi R, Attanasio R, Montini M, et al . Four-years treatment with octreotide-long-acting repeatable in 110 acromegalic patients: predictive value of short-term results? *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3090-8.
 123. Shimon I, Taylor JE, Dong JZ, Bitonte RA, Kim S, Morgan B, Coy DH, Culler MD, Melmed S. Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J Clin Invest*. 1997;99:789-98.
 124. Matrone C, Pivonello R, Colao A, Cappabianca P, Cavallo LM, Del Basso De Caro ML, Taylor JE, Culler MD, Lombardi G, Di Renzo GF, Annunziato L. Expression and function of somatostatin receptor subtype 1 in human growth hormone secreting pituitary tumors deriving from patients partially

responsive or resistant to long-term treatment with somatostatin analogs. *Neuroendocrinology*. 2004;79;142-8.

125. Zatelli MC, Piccin D, Tagliati F, Ambrosio MR, Margutti A, Padovani R, Scanarini M, Culler MD, Degli Uberti EC. Somatostatin receptor subtype 1 selective activation in human growth hormone (GH)-and prolactin (PRL)-secreting pituitary adenomas: effects on cell viability, GH and PRL secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88;2797-802.
126. Miller GM, Alexander JM, Bikkal HA, Katznelson L, Zervas NT, Klibanski A. Somatostatin receptor subtype gene expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol and Metab*. 1995;80(4):1386-92.
127. Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *Journal of Neurochemistry*. 2004;89;1057-91.
128. Casarini AP, Pinto EM, Jallad RS, Giorgi RR, Giannella-Neto D, Bronstein MD. Dissociation between tumor shrinkage and hormonal response during somatostatin analog treatment in an acromegalic patient: preferential expression of somatostatin receptor subtype 3. *J Endocrinol Invest*. 2006;29(9);826-30.
129. Resmini E, Dadati P, Ravetti JL, Zona G, Spaziante R, Saveanu A, Jaquet P, Culler MD, Bianchi F, Rebora A, Minuto F, Ferone D. Rapid pituitary tumor shrinkage with dissociation between antiproliferative and antisecretory effects of a long-acting Octreotide in an acromegalic patient. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(5):1592-9.

130. Murray RD, Kim K, Ren SG, 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(6):3027-32.
131. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC.
Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 2000;288:154-157.
132. Ferone D, de Herder WW, Pivonello R, Kros JM, van Koetsveld PM, de Jong T, Minuto F, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ. Correlation of in vitro and in vivo somatotrophic adenoma responsiveness to somatostatin analogs and dopamine agonists with immunohistochemical evaluation of somatostatin and dopamine receptors and electron microscopy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1412-7.