

**Implicación de las características clínico-patológicas,  
radiológicas y marcadores moleculares en el tratamiento de la  
acromegalia.**

Association between clinicopathological, radiological parameters  
and molecular characteristics in treatment of Acromegaly.

**Autora:**

María Rosa Alhambra Expósito.

**Dirigida por:**

María Ángeles Gálvez Moreno

Justo Pastor Castaño Fuentes

Raúl Miguel Luque Huertas

Programa de doctorado en Biomedicina

Córdoba, Septiembre de 2021



TITULO: *Implicación de las características clínico-patológicas, radiológicas y marcadores moleculares en el tratamiento de la acromegalia*

AUTOR: *María Rosa Alhambra Expósito*

---

© Edita: UCOPress. 2021  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---



**TÍTULO DE LA TESIS:** Implicación de las características clínico-patológicas, radiológicas y marcadores moleculares en el tratamiento de la acromegalia.

**DOCTORANDO/A:** María Rosa Alhambra Expósito

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada por la doctoranda María Rosa Alhambra Expósito bajo nuestra dirección, alcanzando con total éxito los objetivos formativos y científicos planteados al comienzo de la misma. A lo largo de su periodo de formación en investigación, la doctoranda ha completado con aprovechamiento las diferentes actividades formativas incluidas en su programa de doctorado, así como otras complementarias, que le han permitido ampliar y mejorar sus conocimientos y experiencia como investigadora clínica y traslacional. Además, en el desarrollo experimental de su trabajo de Tesis Doctoral ha podido incorporar y aplicar diferentes metodologías de análisis y combinar estrategias de carácter más básico, molecular y celular, con técnicas más clínicas y analíticas. Todo este despliegue de investigación traslacional ha resultado de gran utilidad para los grupos de investigación en los que se ha desarrollado la tesis y han permitido a la doctoranda obtener resultados muy relevantes en el campo de los tumores hipofisarios, y más concretamente, de los somatotropinomas. De manera más específica, los resultados obtenidos durante el desarrollo de su trabajo han permitido a la doctoranda publicar un artículo científico directamente relacionado con su Tesis Doctoral en la revista "*Scientific Reports*", de referencia internacional en el área investigación multidisciplinar, donde aparece entre el 25% más destacado. Asimismo, la doctoranda ha presentado los resultados de su Tesis en diferentes congresos y reuniones de ámbito nacional e internacional.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 18 de Junio de 2021

Firma de los directores

GALVEZ  
MORENO  
MARIA  
ANGELES -  
29077500A

Firmado  
digitalmente por  
GALVEZ MORENO  
MARIA ANGELES -  
29077500A  
Fecha: 2021.06.17  
10:14:35 +02'00'



*A mi pequeña pero gran familia.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Echando la vista atrás y viéndome ahora al final del camino, quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y apoyado en este largo y tortuoso camino.

En primer lugar, agradecer a mis directores la Dra. María Ángeles Gálvez Moreno, el Prof. Dr. Justo Castaño y al Prof. Dr. Raúl Luque por haber confiado en mí y decidir guiarme en la realización de esta Tesis Doctoral. A la Dra. María Ángeles Gálvez, pues representa un referente para mí por su destacada calidad clínica y humana, por su profesionalidad, disponibilidad y apoyo incondicional; por su ejemplo como médico, por su continuo trabajo, esfuerzo y perseverancia en todos los ámbitos, transmitiéndonos a todos su ilusión por la endocrinología. También mi agradecimiento al Prof. Dr. Justo Castaño, por guiarme en el arduo camino de la investigación y permitiendo dar forma a esta tesis. Al Prof. Dr. Raúl Luque, por su excelencia académica, inculcándonos la necesidad de incorporar la investigación para alcanzar la plenitud en nuestra carrera profesional. Al Dr. Alejandro Ibáñez, por su inestimable ayuda en el desarrollo de este trabajo, por sus conocimientos, consejos, y disponibilidad. A la Dra. Concepción Muñoz y a la Dra. Paloma Moreno por nuestras charlas inspiradoras; y a esta última por apoyarme en los momentos en los que las fuerzas se agotan, juntas hemos conseguido avanzar en este camino. A todos los integrantes de nuestra Unidad, por el cariño, esfuerzo y apoyo que han demostrado en todos estos años compartidos.

A mis padres, Antonio y María Rosa, por su amor infinito, confianza ciega, esfuerzo y dedicación, transmitiéndome los valores necesarios para llevarme a ser la persona que soy. A mis hermanas, Rocío y Guadalupe, por acompañarme a lo largo de nuestra vida, estar siempre juntas, apoyándonos en los momentos felices y en los difíciles. A Miguel Ángel, mi marido, por su amor incondicional, apoyo y comprensión, ayudándome a cumplir este sueño. A nuestras hijas, Lucía, Miguel y Antonio, por todos los momentos de juegos robados y por todas las sonrisas compartidas.





## ÍNDICE

1. Resumen.	12
2. Introducción.	18
3. Objetivos	58
4. Material y métodos.	62
4.1. Pacientes.	64
4.2. RMN	65
4.3. Análisis hormonal	66
4.4. Análisis estadístico.	68
5. Resultados.	70
5.1. Características basales.	72
5.2. Estudio de imagen	75
5.3. Estudio molecular del tumor.	80
5.4. Resultados post-cirugía.	82
5.5. Correlación entre los datos clínicos y el estudio molecular.	84
6. Discusión.	86
7. Conclusiones.	96
8. Bibliografía.	100
9. Anexo	110

## ABREVIATURAS

- ACTH: hormona adrenocorticotropa o corticotropina.
- ACTB: Beta actina.
- AVPR1b: receptor de vasopresina subtipo b.
- DA: agonistas dopaminérgicos.
- DR: receptor de dopamina.
- DR1: receptor de dopamina subtipo 1.
- DR2: receptor de dopamina subtipo 2.
- DR2L: variante larga del receptor de dopamina del subtipo 2.
- DR2S: variante corta del receptor de dopamina del subtipo 2.
- DR3: receptor de dopamina subtipo 3.
- DR4: receptor de dopamina del subtipo 4.
- DR5: receptor de dopamina subtipo 5.
- FSH: hormona folículo estimulante.
- GH: hormona de crecimiento.
- GHRA: antagonistas periféricos de la hormona de crecimiento.
- GHRH: hormona liberadora de hormona del crecimiento.
- GHSR1a: receptor de ghrelina subtipo a.
- IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1.
- LH: hormona luteinizante.
- PEG: pegvisomant.
- POMC: proopiomelanocortina
- PTTG: gen transformante de tumor hipofisario.
- PRL: prolactina.
- RC: Radiocirugía.
- REA: registro español de acromegalia.
- RMN: resonancia magnética nuclear.
- SOG: sobrecarga oral de glucosa.
- SRIF: Somatostatina.
- SSA: análogos de somatostatina.
- SST: receptores somatostatina.

- SST<sub>1</sub>: Receptor de somatostatina subtipo 1.
- SST<sub>2</sub>: Receptor de somatostatina subtipo 2.
- SST<sub>3</sub>: Receptor de somatostatina subtipo 3.
- SST<sub>4</sub>: Receptor de somatostatina subtipo 4.
- SST<sub>5</sub>: Receptor de somatostatina subtipo 5.
- TSH: hormona estimuladora del tiroides o tirotrópina.



# 1. RESUMEN



## 1. RESUMEN

La acromegalia se debe a la producción excesiva de hormona del crecimiento (GH), generalmente por un adenoma hipofisario. El tratamiento primario de elección es el quirúrgico, con unos índices de remisión del 80-90% en pacientes con microadenomas y del 50% en los macroadenomas. Sin embargo, la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de la acromegalia como los análogos de somatostatina (SSA) y, en menor medida, los agonistas dopaminérgicos (DA), ha modificado la secuencia terapéutica en algunos casos. Los SSA (octreótida, lanreótida y pasireótida) inhiben la secreción de GH mediante la unión a receptores específicos de la somatostatina (SRIF). En particular, los SSA de primera generación, octreótida y lanreótida, se unen preferentemente a receptores SST<sub>2</sub>; mientras que el SSA de segunda generación, pasireótida, se une a varios receptores y con mayor afinidad a SST<sub>5</sub>. Por su parte, los DA se unen fundamentalmente al receptor de dopamina tipo-2 (DR2). Aunque se ha demostrado que estos fármacos son capaces de reducir los niveles de GH y aliviar algunos síntomas, su eficacia no es generalizada y un porcentaje de los pacientes presentan baja o nula respuesta de partida, o una pérdida de la misma, probablemente asociada a unos bajos niveles de expresión de receptores de SST y dopamina en el adenoma somatotropo.

Por desgracia, hasta el momento actual, no hay descrito ningún parámetro clínico, bioquímico, anatomopatológico, inmunohistoquímico ni molecular a nivel tumoral que nos permita predecir con seguridad la eficacia del tratamiento médico pre-quirúrgico y/o la curación de la acromegalia en los enfermos tratados con cirugía, siendo necesario el seguimiento de por vida en todos los casos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar la posible relación entre las características clínico-patológicas de los pacientes al diagnóstico de la acromegalia y la expresión de distintos receptores moleculares a nivel tumoral. El segundo objetivo de nuestro estudio es analizar si existe una relación entre la señal en T2 en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del adenoma y las características clínico-patológicas de los pacientes al diagnóstico de la acromegalia y/o con la expresión génica de distintos receptores a nivel tumoral, para así poder anticipar cuál podría ser el tratamiento más eficiente en la terapia prequirúrgica

del paciente. Así mismo, como último objetivo se pretendió evaluar la posible capacidad de la expresión de receptores para predecir la curación o recidiva de la acromegalia.

Para ello se diseñó un estudio observacional retrospectivo, en el que se incluyeron 22 pacientes con acromegalia diagnosticados en el servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Reina Sofía que se intervinieron quirúrgicamente, y en los que se realizó el estudio molecular del tumor en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) y el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Córdoba.

Los resultados demuestran que:

- 1) No existen diferencias en cuanto a la curación quirúrgica o el control bioquímico, entre aquellos que recibieron tratamiento con SSA antes de la cirugía, y los que no lo recibieron.
- 2) Los niveles de expresión de los receptores en el adenoma no se correlacionaron con las medidas de IGF-1 o de GH sérica después de la SOG.
- 3) Los adenomas con crecimiento extraselar y concretamente aquellos con crecimiento supraselar tienen mayor expresión de SST<sub>3</sub>, por lo que pasireótida podría ser una alternativa terapéutica. También expresan más DR4, por lo que probablemente sea interesante el estudio de este receptor como diana para el tratamiento de estos pacientes. A su vez, tienen mayor expresión de SST<sub>3</sub> y mayor expresión de Ki67. Concretamente aquellos con crecimiento supraselar tienen mayor expresión de SST<sub>3</sub>, DR4 y DR5 que aquellos sin crecimiento supraselar. Los adenomas con invasión de senos cavernosos también expresan más DR5 que aquellos sin invasión.
- 4) Los niveles de colesterol total basal, y los de LDL-c se correlacionan de forma directa con SST<sub>2</sub>, lo que sugiere que los pacientes con hipercolesterolemia se podrían beneficiar mejor del tratamiento con octreótida o lanreótida.
- 5) Los niveles de cortisol plasmático se relacionan de forma directa con la expresión de SST<sub>2</sub>, SST<sub>3</sub>, SST<sub>5</sub> y DR2L.
- 6) Existe una correlación inversa entre la edad al diagnóstico y la talla y entre la edad al diagnóstico y los niveles de GH plasmáticos.



- 7) Los adenomas hiperintensos en T2 tendían a ser más grandes, sobre todo en el diámetro inferoposteior (DIP) y a ser más invasivos, pues tenían un índice de Knosp mayor. Además, los adenomas hiperintensos en T2 tendían a tener niveles más altos de IGF-1 y un nadir menor de GH tras SOG, y mayor expresión de DR5 y Ki67 que aquellos isointensos.
- 8) La expresión de DR5 se correlaciona de forma directa con los diámetros DAP y DIP, y también existe una correlación directa entre el índice de Knosp y la expresión de DR5 y de SST<sub>3</sub>. Además, el índice de proliferación Ki67 se correlacionó de forma directa con la expresión de DR5, SST<sub>2</sub> y SST<sub>3</sub>.
- 9) Los adenomas con mayores niveles de expresión del DR2T muestran una correlación con un mejor control bioquímico de los pacientes.



## 2. INTRODUCCIÓN

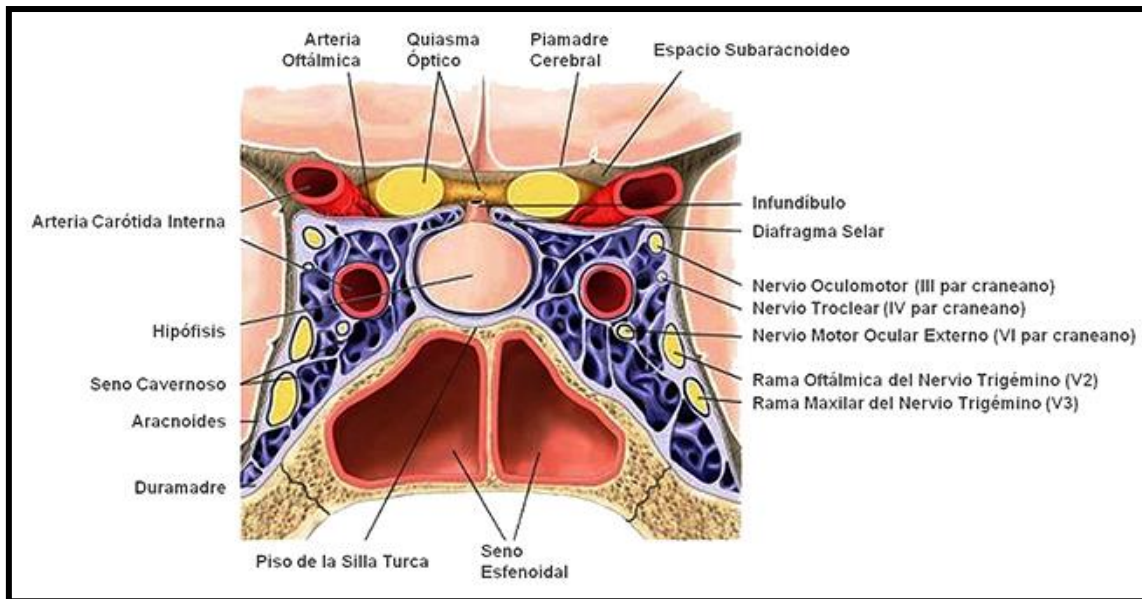


## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Hipófisis.**

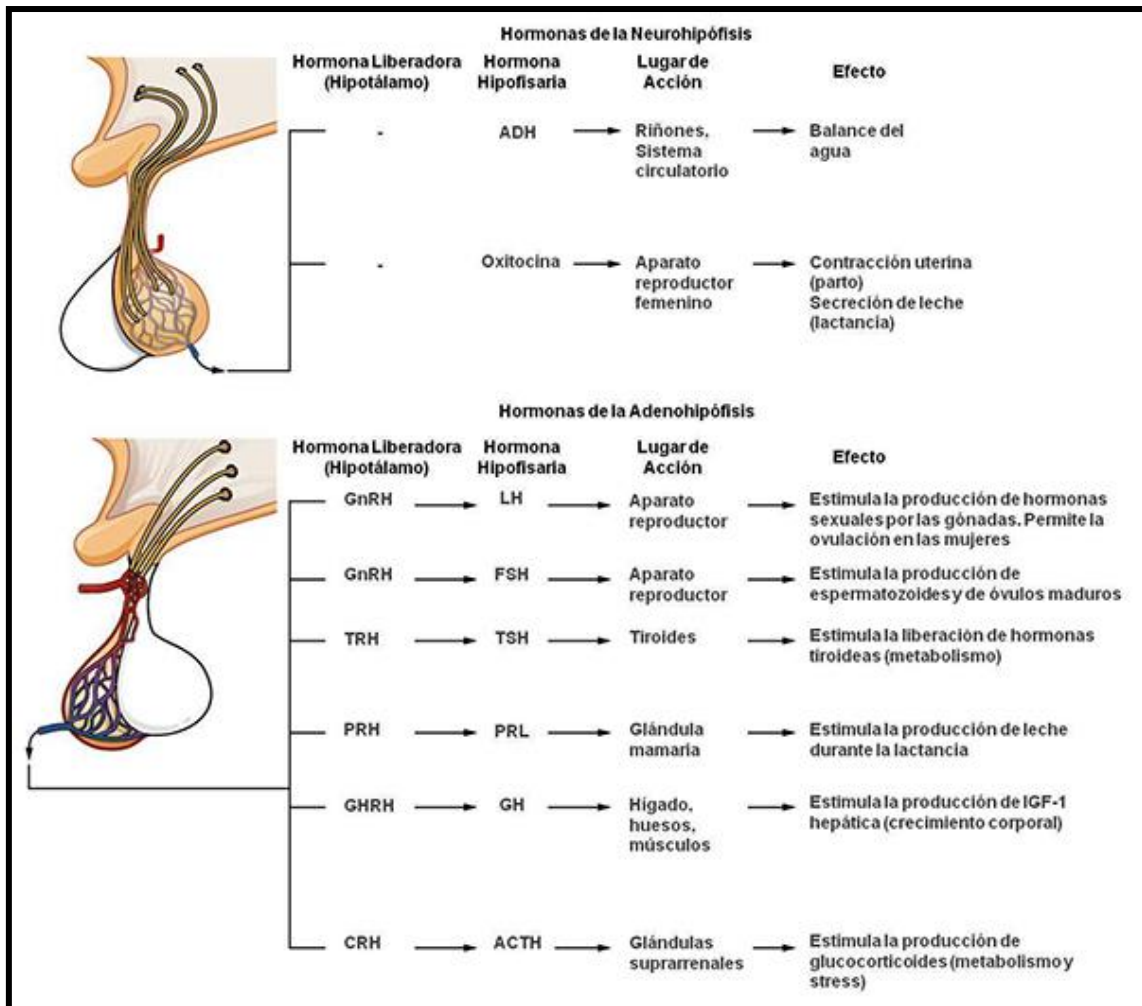
La hipófisis se encarga de regular de forma compleja e integrada el funcionamiento de otras glándulas endocrinas, siendo el tallo hipofisario la conexión anatómica y funcional de la hipófisis con el hipotálamo. La hipófisis está formada por la adenohipófisis que comprende un lóbulo anterior y un lóbulo intermedio, y la neurohipófisis o lóbulo posterior. Se encuentra situada en el interior de la silla turca y está recubierta por el diafragma dural de la silla, a través del cual el tallo hipofisario conecta con la eminencia media del hipotálamo[1].

La silla turca está localizada en la base del cráneo y forma el techo óseo del seno esfenoidal. Las paredes laterales, formadas por tejido óseo o dural, limitan con los senos cavernosos, que están atravesados por los pares craneales tercero, cuarto y sexto, así como las arterias carótidas internas (figura 1). Por tanto, el contenido del seno cavernoso es vulnerable a un eventual aumento de la expansión intraselar. El quiasma óptico, localizado por delante del tallo hipofisario, está situado directamente por encima del diafragma selar. En consecuencia, las vías ópticas y las estructuras centrales son vulnerables a los posibles efectos de presión de una masa hipofisaria en expansión. En contraste con la adenohipófisis, el lóbulo hipofisario posterior o neurohipófisis está innervado directamente por los tractos nerviosos supraóptico-hipofisarios y tuberohipofisarios del tallo posterior[1].



**Figura 1.** Relaciones anatómicas de la hipófisis. (Williams, Tratado de Endocrinología. 11ª Edición).

Las células nerviosas del hipotálamo sintetizan y secretan hormonas peptídicas o aminérgicas que estimulan o inhiben la secreción de las hormonas hipofisarias y que se liberan directamente a los vasos portales del tallo hipofisario. El plexo portal hipotalámico-hipofisario es la fuente principal de aporte sanguíneo a la hipófisis anterior, lo que permite una transmisión segura de la secreción pulsátil de péptidos hipotalámicos sin que éstos sufran una dilución significativa; así pues, las células hipofisarias se ven expuestas a picos de factores de liberación o inhibición de modo que, a su vez, liberan sus hormonas en forma de pulsos separados. En la adenohipófisis existen cinco tipos distintos de células secretoras de hormonas (Figura 2). Las células corticotropas producen péptidos derivados del precursor proopiomelanocortina (POMC), fundamentalmente la hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH); las células somatotropas producen hormona del crecimiento (GH); las células tirotropas sintetizan una subunidad glucoproteica  $\alpha$  común y la subunidad  $\beta$  específica de tirotrópina u hormona estimuladora del tiroides (TSH); las células gonadotropas expresan la subunidad  $\alpha$  común y las subunidades  $\beta$  de la hormona foliculoestimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH); y las células lactotropas producen prolactina (PRL). Cada tipo celular se encuentra bajo una regulación altamente específica que controla su respectiva expresión genética y actividad funcional diferenciada.



**Figura 2.** Secreción de hormonas por parte de la hipófisis y sus principales dianas funcionales. ADH: Hormona antidiurética; GnRH: Hormona estimulante de gonadotropinas; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; TRH: hormona estimulante de TSH; TSH: hormona estimulante del tiroides; PRH: hormona estimulante de prolactina PRL: prolactina; GHRH: hormona estimulante de GH, GH: hormona de crecimiento; CRH: hormona estimulante de la ACTH; ACTH: hormona adenocorticotrópica o corticotropina. [2]

Existen tres niveles de control que regulan la secreción de hormonas en la adenohipófisis. El control hipotalámico es el primario y fundamental y está mediado por las hormonas hipofisiotrópicas secretadas en el sistema portal, que actúan selectivamente en sus células diana de la adenohipófisis a través de receptores de membrana. En ella, los distintos receptores unidos a proteínas G son altamente selectivos y específicos para cada una de las hormonas hipotalámicas y provocan la aparición de señales estimuladoras o inhibitoras que regulan la transcripción del gen de la hormona hipofisaria correspondiente, así como su síntesis y, en última instancia, su

secreción. Por su parte, las hormonas y otras señales periféricas también participan en la modulación de la función de las células hipofisarias, principalmente a través de una regulación por retroalimentación negativa de las hormonas tróficas por parte de las hormonas producidas por sus respectivas glándulas y tejidos diana. Existe asimismo una regulación por retroalimentación ultracorta ejercida por la hipófisis sobre sus propias células y sobre el hipotálamo.

Los tumores o adenomas hipofisarios son la causa más frecuente de los síndromes de hipersecreción e hiposecreción de hormonas hipofisarias en el adulto. Representan alrededor del 10% de todas las neoplasias intracraneales. Los tumores hipofisarios son generalmente neoplasias benignas, que no metastatizan, de ahí que se suelen denominar adenomas. Se pueden originar a partir de cada uno de los cinco tipos celulares de la hipófisis anterior, de tal modo que el fenotipo clínico y bioquímico de los tumores va a depender del tipo celular del que proceden. Así, los derivados de las células lactotropas (PRL), somatotropas (GH), corticotropas (ACTH), tirotropas (TSH) o gonadotropas (LH, FSH) secretan un exceso de la hormona correspondiente. Los tumores plurihormonales expresan combinaciones de GH, PRL; TSH, ACTH y de la subunidad alfa glucoproteica, diagnosticándose mediante análisis inmunohistoquímico y/o bioquímico, así como por las manifestaciones clínicas de características combinadas de estos síndromes de hipersecreción hormonal. Desde un punto de vista morfológico, estos tumores pueden originarse a partir de un solo tipo celular plurisecretor o estar formados por células con funciones distintas dentro del mismo tumor.

Los tumores con actividad hormonal se caracterizan por tener secreción autónoma, con escasa respuesta a las vías normales de inhibición. No siempre existe correlación entre la producción hormonal y el tamaño del tumor. Con frecuencia, adenomas pequeños con una activa secreción hormonal pueden producir alteraciones clínicas importantes, mientras que otros adenomas de mayor tamaño, pero con menor producción hormonal pueden ser clínicamente silenciosos y pasar inadvertidos, salvo que produzcan efectos compresivos centrales. De hecho, alrededor de la tercera parte de todos los adenomas son de este último tipo y se conocen como no funcionantes al no producir un síndrome



clínico hipersecretor. Por su parte, los carcinomas hipofisarios, con metástasis extracraneales confirmadas, son extraordinariamente raros.

La reciente clasificación de la OMS de 2017 agrupa los tumores hipofisarios neuroendocrinos en las 3 líneas celulares de la adenohipófisis de las que proceden mediante la determinación inmunohistoquímica de los correspondientes factores de transcripción hipofisarios (FTH) [3]. Este agrupamiento facilita una aproximación diferente al diagnóstico patológico de los tumores hipofisarios [4]. Además, se ha propuesto que en el informe del patólogo figuren también datos clínicos (tumor funcionante/silente; presencia y grado de invasión radiológica) y datos de actividad proliferativa (MIB1-LI/Ki-67, número de mitosis y p53) con el objetivo de diseñar una clasificación clínico- patológica con capacidad pronóstica (Tabla 1).

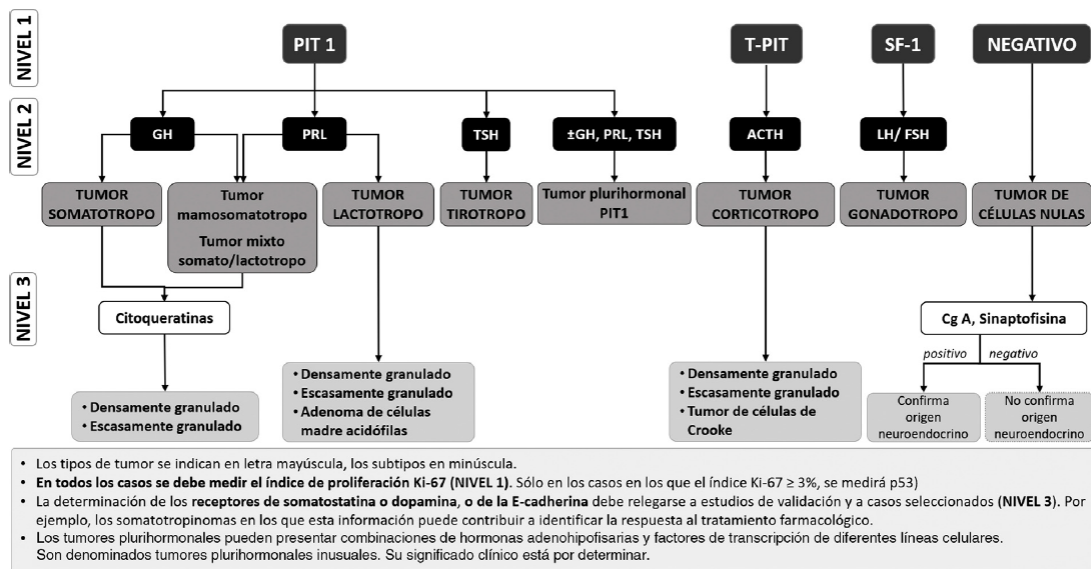
Las recomendaciones del *European Pituitary Pathology Group* acerca del estudio inmunohistoquímico de los tumores neuroendocrinos hipofisarios se dividen en tres niveles. Un primer nivel en que se miden hormonal, citoqueratinas y marcadores de proliferación; un segundo nivel que incluye los factores de transcripción hipofisarios (FTH) y el tercer nivel que se reserva para casos seleccionados en el que se mediría cromogranina A (en todos los tumores inmunonegativos o escasamente positivos), SST, E-cadhereína o P53 [5].

**Tabla 1.** Clasificación de los tumores hipofisarios. Modificado de la clasificación de la OMS de tumores de la glándula hipofisaria [3] y de la de Picó et al [4].

<i>Tipo de adenoma</i>	<i>Variante morfológica</i>	<i>Hormonas hipofisarias y otros inmunomarcadores</i>	<i>FTH y otros cofactores</i>
<i>Adenoma somatotropo</i>	Densamente granulado	GH ± PRL ± subunidad α. Patrón perinuclear o difuso de citoqueratinas	PIT-1
	Escasamente granulado	GH ± PRL, patrón en gota de citoqueratinas	PIT-1
	Mamosomatotropo	GH + PRL (en mismas células) ± subunidad α	PIT-1, ER α

	Mixtosomatotro- lactotroppo	GH + PRL (en células diferentes) ± subunidad α	PIT-1, ER α
<i>Adenoma lactotroppo</i>	Densamente granulado	PRL difusa	PIT-1, ER α
	Escasamente granulado	PRL perinuclear	PIT-1, ER α
	Acidófilo de células madre	PRL, GH (focal y variable) Patrón en gota de citoqueratinas	PIT-1, ER α
<i>Adenoma tirotrppo</i>		β-TSH ± subunidad α	PIT-1, GATA 2
<i>Adenoma corticotroppo</i>	Densamente granulado	ACTH Patrón difuso de citoqueratinas.	T-PIT
	Escasamente granulado	ACTH Patrón difuso de citoqueratinas.	T-PIT
	De células de Crooke	ACTH	T-PIT
<i>Adenoma gonadotroppo</i>		β-TSH, β-LH ± subunidad α	SF-1, GATA2, ERα
<i>Adenomas de células nulas</i>		Ninguno	Ninguno
<i>Adenoma plurihormonal</i>	Adenoma plurihormonal	GH, PRL, β-TSH ± subunidad α	PIT-1
	Adenomas con combinaciones inusuales	Combinaciones diversas: ACTH/GH, ACTH/PRL	N/A

Sin embargo, en aquellos centros donde se puedan medir los FTH de forma rutinaria, el consenso de expertos de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición y la Sociedad Española de Anatomía Patológica propone una secuencia diagnóstica diferente, que se recoge en la figura 3[4]. Este esquema sería más eficiente en la identificación precisa de la mayor parte de los tumores neuroendocrinos hipofisarios y supondría un importante ahorro de anticuerpos y de tiempo. Los tumores plurihormonales no se identificarán con tanta precisión con esta estrategia, pero suponen menos del 1% de todos los tumores neuroendocrinos hipofisarios.



**Figura 3.** Propuesta de algoritmo diagnóstico de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición y la Sociedad Española de Anatomía Patológica, en base a la determinación en un primer escalón de los factores de transcripción hipofisarios [4].

PIT-1: factor de transcripción 1 específico de la hipófisis; T-PIT: el factor de transcripción t-box; SF-1: factor esteroideogénico-1. ACTH: hormona corticotropa; GH: hormona del crecimiento; FSH: hormona foliculoestimulante; LH: hormona luteinizante; PRL: prolactina; TSH: hormona estimulante de la tiroides. Cg-A: cromogranina A.

## **2.2 Acromegalia**

### **A- Epidemiología**

La acromegalia es una enfermedad infrecuente, con una prevalencia de 2,8-13,7 casos por 100.000 habitantes y una incidencia de 0,2-1,1 casos nuevos por 100.000 habitantes y año [6, 7]. En la mayoría de las series no hay diferencia entre hombres y mujeres (Hombres: 0,2 -1 /100.000 habitantes/año; Mujeres: 0,3-1,2 /100.000 habitantes/año [6]. Estudios publicados entre 1980-2001 daban una prevalencia entre 3,8 – 6,9 /100.000 habitantes y una incidencia entre 0,28 – 0,4 /100.000 habitantes [8, 9]. Las tasas más altas de los estudios contemporáneos pueden ser atribuidas a la metodología utilizada (fuente de datos: población vs centros de referencia o búsqueda intensiva de casos), a una mayor concienciación de la enfermedad hipofisaria y a los avances y mejoras en las herramientas de diagnóstico. También, dichas tasas pueden deberse al hecho de que los pacientes afectados buscan atención médica antes en los últimos años, o bien reflejar un verdadero aumento en la incidencia. En el registro español de acromegalia (REA) se calculó una prevalencia de 6,9 casos por 100.000 habitantes y una incidencia de 0,21 casos por 100.000 habitantes y año [7]. La prevalencia osciló entre 1,57-7,58 casos por 100.000 habitantes en función de la comunidad autónoma. En el REA sí se describe una prevalencia superior en mujeres (60,8%). Este hecho se confirma en el estudio Acropaxis, en el que la prevalencia en mujeres es del 59,8% [10].

### **B- Patogenia**

La acromegalia se origina por una producción excesiva de GH debido, en más del 95% de los casos, a un adenoma hipofisario; mientras que en el 5% restante de los casos se debe a la producción neoplásica ectópica de GH o GHRH [11]. En concreto, más del 90% de los pacientes con acromegalia presentan un adenoma hipofisario benigno monoclonal. Alrededor del 25% de los adenomas secretores de GH secretan también prolactina [12]. En cambio, son raros los adenomas plurihormonales que secretan GH

junto a dos o más hormonas (TSH, ACTH, FSH LH, o subunidad  $\alpha$ ). El carcinoma hipofisario metastásico que secreta GH es extremadamente raro. Existen algunos casos de adenomas somatotropos clínicamente silentes que se caracteriza por niveles normales o altos de GH y factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) [4, 11, 13].

Los síndromes familiares asociados con la hipersecreción de GH incluyen la neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (inactivación de células germinales del gen supresor de tumores MENIN, que incluye tumores hipofisarios, paratiroides y pancreáticos), síndrome de McCune-Albright (mutación activante de *GNAS*; la clínica incluye displasia fibrosa polioestótica, pigmentación cutánea e hipersecreción hipofisaria) y complejo de Carney (mutaciones del gen *PRKAR1A*; el aspecto clínico incluye pigmentación de la piel, mixomatosis mucocutánea, mixomas cardíacos, lesiones tiroideas y mamarias, y adenoma hipofisario secretor de GH) [11]. La acromegalia familiar aislada se describe por una pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 11q13 [14] y, se han asociado a mutaciones en la línea germinal de baja penetrancia del gen de la proteína que interactúa con el receptor de hidrocarburos de arilo (*AIP*) que se encontraron en individuos con predisposición a adenoma hipofisario familiar [15, 16]. Otras causas poco frecuentes de hipersecreción de GH son los tumores de células de los islotes pancreáticos extrahipofisarios y centrales (hamartoma hipotalámico, coristoma y ganglioneuroma) o periféricos (tumores neuroendocrinos) productores de GHRH [11]. Recientemente, se ha definido un cuadro de gigantismo de comienzo muy precoz, a partir del primer año de vida, asociado a microduplicaciones de la región Xq26.3, denominado síndrome X-LAG o *X-linked acrogigantism syndrome* [17]. Clínicamente se comportan como niños con crecimiento adecuado al nacimiento (porque el crecimiento intraútero está principalmente mediado por IGF-2), que desarrollan gigantismo en los primeros 2 años de vida. Habitualmente está causado por macroadenomas y/o hiperplasia, con producción exagerada de GH y a menudo de PRL, con niveles discretamente elevados de GHRH, lo que implicaría desregulación tanto hipofisaria como hipotalámica (Tabla 2)[18].

**Tabla 2.** Síndromes genéticos asociados con acromegalia o gigantismo. Adaptado de Hannah-Shmouni et al [18] . (AD: autosómico dominante)

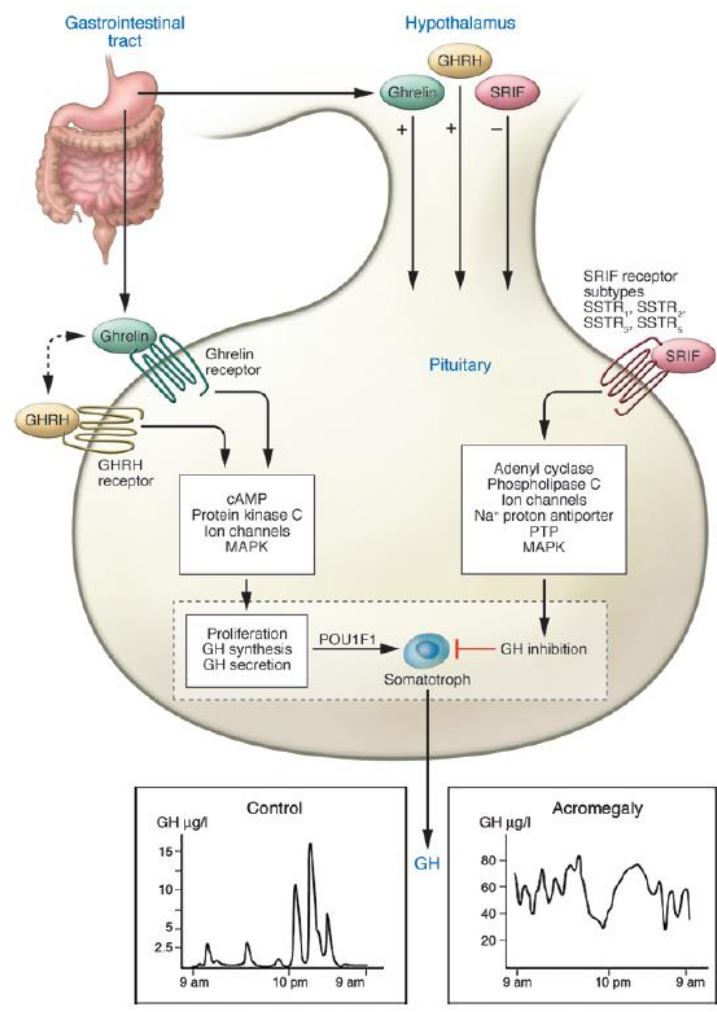
<i>Síndrome</i>	<i>Gen</i>	<i>Cromosoma</i>	<i>Función</i>	<i>Herencia</i>
<i>Acromegalia familiar aislada</i>	<i>AIP</i>	11q13.3	Supresor de tumores	AD o esporádico
<i>Acromegalia ligada al cromosoma X</i>	<i>GPR101</i>	Xq26.3	Oncogen	Ligado a cromosoma X o esporádico.
<i>Complejo Carney</i>	<i>PRKAR1A</i>	17q24.2	Supresor de tumores	AD
<i>Neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (MEN1)</i>	<i>MEN1</i>	11q13.1	Supresor de tumores	AD o esporádico
<i>Neoplasia endocrina múltiple tipo 4 (MEN4)</i>	<i>CDKN1B</i>	12p13.1	Supresor de tumores	AD
<i>Síndrome de Mc-Cune Albright</i>	<i>GNAS1</i>	20q13.32	Oncongen	Esporádico
<i>Paraganglioma, feocromocitoma y asociación con adenoma hipofisario</i>	<i>SDHA</i> <i>SDHB</i> <i>SDHC</i> <i>SDHD</i>	5p15.33 1p36.13 1q23.3 11q23.1		AD o esporádico.

### B.1 Acción de la GH

El desarrollo de la hipófisis anterior sigue un curso altamente especializado que parte de células madre precursoras, con una diferenciación marcada en los tipos de células secretoras de hormonas. Las células somatotropas representan más del 50% de las células secretoras de la hipófisis. La diferenciación de este tipo celular y la capacidad para sintetizar y secretar GH vienen determinadas por factores de transcripción como PROP1 (Prophet of Pit-1) que es un factor de transcripción del tipo 1 homeodominio *paired-like*, y POU1F1 (*POU domain class 1, transcription factor 1*), localizado en el cromosoma 3p11 y perteneciente a la familia POU de los genes homeobox [19]. En el brazo largo del cromosoma 17 se localiza una familia de genes que codifica distintos tipos de proteínas lacto-somatotrópicas, que incluyen, además de la propia GH humana hipofisaria (hGH), una variante placentaria de la misma conocida como hGH-V, el lactógeno placentario y la PRL. La molécula de hGH consta de 191-aa y posee características estructurales especialmente relevantes para su función peptídica,

incluyendo la tercera hélice  $\alpha$ , que comprende elementos de un dominio anfifílico importantes para la señalización y la integridad del gran bucle helicoidal necesarios para las acciones de promoción del crecimiento. Existe asimismo una molécula de hGH resultante de un splicing alternativo que carece de los aa 32-46 y se designa como GH de 20 kDa. La GH media el crecimiento esquelético lineal y también regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y minerales[20]. La mayoría de las acciones de promoción del crecimiento de GH están mediadas por IGF-1.

La GHRH, la ghrelina, y la somatostatina atraviesan el sistema portal hipofisario para regular la producción de GH por las células somatotropas de la adenohipófisis (25) (Figura 3).



**Figura 3.** Eje GRHR- GH- IGF-1. La secreción de GH es el resultado de la integración de señales hipotalámicas, nutricionales, hormonales e intrahipofisarias. La síntesis y secreción de la hormona de

crecimiento son inducidas por la GHRH hipotalámica y por la ghrelina proveniente del tracto gastrointestinal. La GHRH también puede influir sobre el receptor de la ghrelina en la hipófisis. Por su parte, la somatostatina (SRIF) secretada por el hipotálamo es la encargada de suprimir la secreción de la GH al unirse a sus receptores en las células somatotropas. El receptor de la GH se expresa ampliamente en todo el organismo, incluidos el hígado y el cartílago. Al unirse la GH a su receptor se induce la liberación de IGF-1, el cual a su vez estimula la proliferación celular e inhibe la apoptosis. Además, el IGF-1 tiene un efecto negativo sobre la secreción de la GH. (GH: hormona de crecimiento, GHRH: hormona liberadora de GH, IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1; GHR: receptor de GH; SRIF: somatostatina; SSTR: receptor de somatostatina) [20].

La GHRH actúa a través de un receptor específico, el GHRHR, perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembrana, que induce y mantiene la función somatotropa estimulando la diferenciación y proliferación, y activando la transcripción del gen de GH y la secreción de esta hormona. La secreción hipotalámica de GHRH es pulsátil, lo que se traduce en pulsos periódicos de secreción de GH. Por su parte, la ghrelina actúa tanto a nivel del hipotálamo como en la propia somatotropa a través de su receptor, denominado receptor del secretagogo de GH de tipo 1a (GHS-R1a) para inducir la secreción de GH en sinergia con GHRH. GHRH también puede influir sobre la señalización de ghrelina actuando como un coagonista alostérico para el GHS-R1a. Por tanto, GHRH y ghrelina actúan coordinadamente para regular la función hipofisaria y la homeostasis energética [21].

La somatostatina (SRIF, del inglés *somatotropin release inhibiting factor*) actúa a través de una familia de cinco receptores, acoplados a proteínas G y con 7 dominios transmembrana, denominados SST<sub>1</sub> a SST<sub>5</sub>. En concreto, la somatostatina hipotalámica actúa sobre las somatotropas hipofisarias fundamentalmente a través de SST<sub>2</sub> y SST<sub>5</sub>, atenuando la duración y amplitud de los pulsos secretores de GH. De este modo, la secreción de GH se caracteriza por pulsos secretores episódicos, intercalados con una secreción basal mínima, que vienen determinados por la edad, el sexo, los nutrientes específicos, los neurotransmisores, el ejercicio y el estrés. Por ello, las mediciones aleatorias de GH generalmente son muy bajas durante aproximadamente el 80 % del día y pueden variar desde indetectables hasta picos secretores de hasta 15 µg/l o más en sujetos normales; estos picos se observan principalmente de noche. El aumento del índice de masa corporal (IMC) y la obesidad atenúan la secreción de GH, mientras que la desnutrición y el ayuno prolongado dan como resultado una frecuencia y amplitud más elevada del pulso de GH.



## B.2 Señalización GH

El gen que codifica el receptor de GH (GHR), genera un receptor de tipo tirosina quinasa, de la familia de citoquinas pleiotrópicas de clase I, que se expresa de manera ubicua, especialmente en el hígado, la grasa y el músculo. La molécula de GH interactúa con un dímero preformado de moléculas de GHR idénticas, que tras la unión sufre una rotación y desencadena la señalización del complejo ligando-receptor [22]. Como consecuencia, dos moléculas de quinasas Janus (JAK2) se autofosforilan y también fosforilan el dominio citoplásmico del GHR. A través de vías subsiguientes de transducción de señales intracelulares, dependientes e independientes de JAK2, la unión GH-GHR evoca en sus células diana respuestas pleiotrópicas que incluyen la síntesis de IGF-1, el metabolismo de la glucosa, la proliferación celular y los cambios en el citoesqueleto. STAT5b es la molécula intracelular clave precisa para la mediación de GH en el crecimiento posnatal, la función del tejido adiposo y el dimorfismo sexual de la expresión de genes hepáticos [23]. Es importante destacar que STAT5b activado por GH induce la transcripción del gen IGF1, y distintas pruebas apuntan a esta vía como crítica para iniciar y mantener el crecimiento esquelético. En humanos, mutaciones de STAT dan como resultado una insensibilidad relativa a la GH y un retraso del crecimiento. La GH también induce genes de respuesta temprana que preceden al crecimiento y diferenciación celular, señales mediadas por la proteína  $\beta$  de unión al potenciador CCAAT y los sitios del elemento de respuesta sérica en el promotor del gen c-fos.

El GHR también se puede trasladar al núcleo por la vía importina  $\alpha/\beta$  junto con el activador coactivador (CoAA). Los objetivos genéticos para la acción nuclear mediada por GHR son predominantemente proproliferativos. Así, tanto la CoAA como la STAT5 activada son necesarias para las acciones pro-proliferativas del GHR nuclear dependientes de la GH [24].

STAT5b media las señales de GH sexualmente dimorfas. Las hembras exhiben pulsos secretores de GH más frecuentes e intervalos entre pulsos más cortos, lo que lleva a una resistencia relativa de la inducción de STAT5 hepática femenina por GH en comparación con la de los machos. La interrupción dirigida de STAT5b conduce a tasas de crecimiento reducidas selectivas para hombres y pérdida de la inducción de genes hepáticos específicos de género. La insensibilidad al GHR puede ocurrir como consecuencia de la

escisión del dominio del receptor extracelular. Asimismo, el IGF-1 también puede inhibir directamente la translocación de GHR a la superficie celular, lo que probablemente contribuye a un bucle de retroalimentación.

### B.3 IGF-1

IGF-1 es una hormona polipeptídica crucial para mediar las acciones de la GH, que se sintetiza principalmente en el hígado, pero también en tejidos extrahepáticos (especialmente hueso, músculo y riñón) e incluso en la propia hipófisis. IGF-1 media la mayoría de las acciones de promoción de crecimiento de GH [25], actuando a niveles tanto endocrinos como paracrinos y regula por retroalimentación negativa la síntesis y secreción de GH. Aproximadamente el 80% de la IGF-1 circulante se origina en el hígado, y las proteínas de unión de alta afinidad, incluidas la proteína 3 de unión a IGF (IGFBP3) y la subunidad lábil al ácido (ELA), también median la actividad de IGF-1 regulando su acceso al receptor de la superficie celular[26]. El IGF-1 actúa tanto de manera endocrina para mediar en el crecimiento de los tejidos, como de manera autocrina / paracrina para regular el crecimiento local. En última instancia, las respuestas de crecimiento de órganos a IGF-1 están determinadas por el potencial intrínseco de los tejidos locales para replicarse.

### B.4 Señalización de GH e IGF-1 en acromegalia.

En la acromegalia, las respuestas celulares provocadas por los altos niveles de GH superan los mecanismos intracelulares que atenúan la señalización de GH, incluidos los mediados por proteínas señalizadoras clave, como SOCS (supresores de la señalización de citoquinas), la quinasa Src y las vías de tirosina fosfatasa [21]. Por otra parte, una eliminación sin cambio de marco de lectura en el exón 3 da como resultado una isoforma de GHR desprovista de 22 aminoácidos (conocida como d3-GHR), que se asocia con una mayor capacidad de respuesta de la GH, como lo demuestra la mayor activación de STAT5 y el crecimiento acelerado. d3-GHR también se asocia con un fenotipo de acromegalia bioquímica y clínicamente más florido y la resistencia relativa de los niveles de IGF-1 al tratamiento de la acromegalia [20].

Los ratones transgénicos que sobreexpresan GH o IGF-1 exhiben un crecimiento somático incrementado que recuerda a la acromegalia, si bien varias características

distintivas de estos animales apuntan a funciones independientes y únicas tanto para GH como para IGF-1. Por ejemplo, los ratones transgénicos que sobreexpresan GH, pero no IGF-1, presentan agrandamiento del hígado, bazo y riñón con características de glomeruloesclerosis renal. En cambio, los ratones con sobreexpresión de IGF-1 son obesos, a diferencia de los transgénicos de GH, de forma muy similar a la acromegalia, por una reducción de la masa grasa y una masa corporal magra aumentada [27].

### C- Clínica

Las manifestaciones clínicas de la acromegalia incluyen síntomas y signos (Figura 4) derivados del efecto compresivo del adenoma hipofisario, como son cefalea, defectos campimétricos, hiperprolactinemia, compresión del tallo hipofisario, hipopituitarismo, hipotiroidismo, hipocortisolismo o hipogonadismo. También existen manifestaciones por el exceso de GH o IGF-1, como son visceromegalias, cambios faciales o crecimiento de las partes acras; y además, manifestaciones cardiovasculares como insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad coronaria o hipertensión arterial; y otras manifestaciones metabólicas, óseas o respiratorias, tales como la diabetes mellitus, bocio, artralgias, apnea del sueño e insuficiencia respiratoria entre otras (tabla 3 [28]). Son muy característicos el prognatismo y el engrosamiento cutáneo. El efecto de un somatotropinoma en pacientes jóvenes, antes del cierre epifisario, se manifiesta como un crecimiento acelerado y gigantismo. La prevalencia de las características clínicas se muestran en la tabla 4 [29]. Las manifestaciones clínicas en cada paciente dependen de las concentraciones de GH e IGF-1, de la edad, el tamaño del tumor y del retraso en el diagnóstico [30]. Al revisar la literatura disponible, Holdaway y Rajasoorya estimaron que este retraso oscilaba entre 6,6 y 10,2 años, con un retraso promedio de 8 años [9]. En el estudio de Reid *et al.* [31], con 324 pacientes, el retraso en el diagnóstico (alrededor de 6 años) y las características en el momento del diagnóstico no cambiaron de 1981 a 2006.

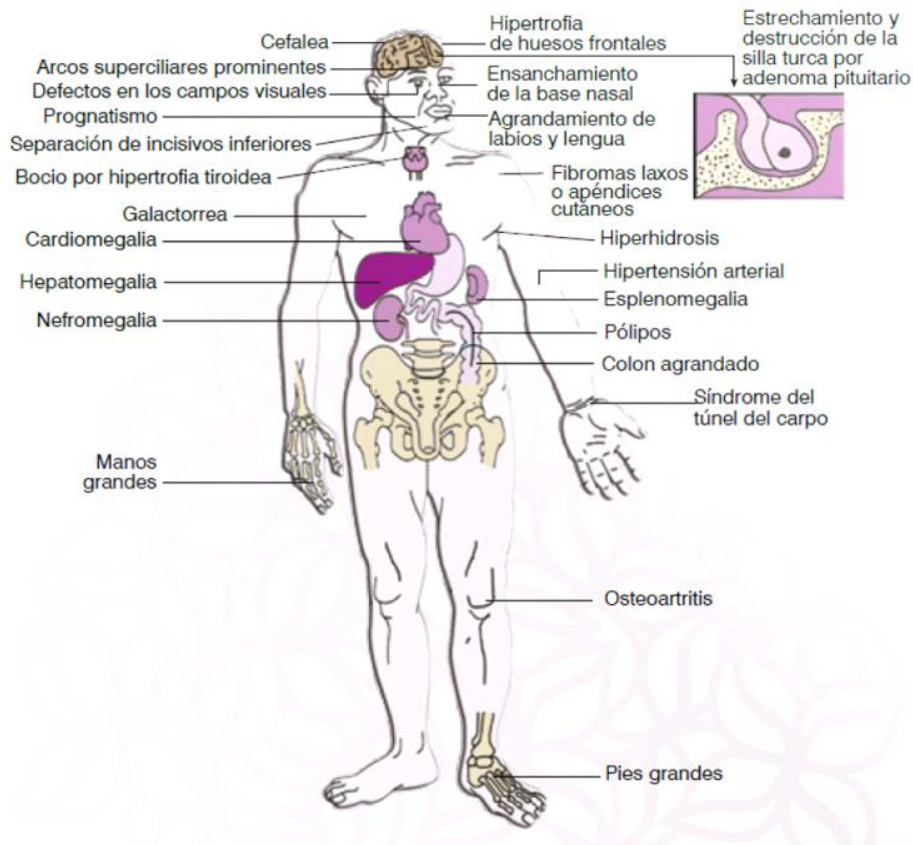


Figura 4. Principales signos del paciente con acromegalia [32].

Tabla 3. Manifestaciones clínicas y analíticas de la acromegalia (modificado de Cordido *et al* [28])

<b>Efecto compresivo del adenoma hipofisario.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cefalea.</li> <li>- Defectos campimétricos.</li> <li>- Hiperprolactinemia.</li> <li>- Compresión del tallo hipofisario.</li> <li>- Hipopituitarismo (hipotiroidismo, hipogonadismo, hipocortisolismo).</li> </ul>
<b>Efectos sistémicos del exceso de GH/IGF-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Visceromegalias.</li> <li>- Cambios cutáneos y de partes blandas.</li> <li>- Engrosamiento de partes acras.</li> <li>- Engrosamiento cutáneo e hipertrofia de tejidos blandos.</li> <li>- Hiperhidrosis.</li> <li>- Papiloma cutáneo y acantosis nigricans.</li> </ul>
<b>Manifestaciones cardiovasculares</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hipertrofia biventricular o septal asimétrica.</li> <li>- Insuficiencia cardiaca congestiva.</li> <li>- Enfermedad coronaria.</li> <li>- Arritmias.</li> <li>- Hipertensión.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Miocardiopatía.</li> </ul>
<b>Manifestaciones metabólicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Intolerancia a la glucosa.</li> <li>- Diabetes mellitus.</li> <li>- Resistencia a la insulina.</li> </ul>
<b>Manifestaciones respiratorias</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Macroglosia.</li> <li>- Maloclusión de la mandíbula.</li> <li>- Obstrucción de la vía aérea superior.</li> <li>- Alteración del sueño.</li> <li>- Apnea del sueño.</li> <li>- Alteración en la ventilación.</li> </ul>
<b>Manifestaciones óseas y articulares</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento del grosor del cartílago articular.</li> <li>- Artralgias y artritis.</li> <li>- Síndrome del túnel carpiano.</li> <li>- Osteopenia.</li> </ul>
<b>Otras manifestaciones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bocio.</li> <li>- Hipercalciuria.</li> <li>- Galactorrea.</li> <li>- Disminución de la libido, disfunción eréctil.</li> <li>- Irregularidades menstruales.</li> </ul>

**Tabla 4.** Prevalencia de signos y síntomas de acromegalia [29].

<b>&lt;30%</b>	<b>30-60%</b>	<b>&gt;60%</b>
Depresión	Cefalea	Crecimiento acral
Reducción de libido	Disfunción eréctil	Deformidad facial
Síndrome del túnel carpiano	Artritis	Hiperhidrosis
Somnolencia diurna	Astenia/fatiga	Edema de tejidos blandos
Miopatías	Neuropatía periférica	
Aumento del grosor del pelo		
Galactorrea		

### C.1 Efectos por la compresión del tumor

- Cefalea: Aparece en torno al 60% de los pacientes y puede ser grave y desproporcionada al tamaño del tumor. Puede reflejar el crecimiento tumoral con la dilatación de la duramadre, la invasión del seno cavernoso con la irritación del nervio trigémino o por la hipersecreción de GH en sí misma [29, 33].
- Trastornos visuales: El crecimiento del adenoma cranealmente puede comprimir el quiasma óptico, lo que lleva a alteraciones del campo visual, que comienzan en la periferia media de los sectores temporales superiores, y progresa a hemianopsia bitemporal. La compresión persistente puede resultar en ceguera [29, 34].
- Hiperprolactinemia: Aparece en aproximadamente un tercio de los pacientes como consecuencia de la compresión del tallo hipofisario o por la co-secreción de prolactina por el tumor. La hiperprolactinemia suele ser leve [ $< 100$  ng/ml (2100 mIU/L), valores de normalidad en hombres: menos de 20 ng/ml, mujeres no embarazadas: menos de 25 ng/ml y mujeres embarazadas: 80 a 400 ng/ml] y muy rara vez, puede llegar a 5000 ng/dL o más (aproximadamente 105.000 mIU/L) [29, 35, 36] en los casos de adenomas cosecretores de GH- PRL.
- Hipopituitarismo: dado que alrededor del 80% de los adenomas que producen GH son macroadenomas, existe un cierto grado de hipopituitarismo hasta en tres cuartas partes de los pacientes, en el momento del diagnóstico[29].

### C.2 Manifestaciones sistémicas

- Crecimiento de partes acras: El crecimiento excesivo de manos y pies está presente en la gran mayoría de pacientes acromegálicos en grandes series [29]. Se debe principalmente al aumento de los tejidos blandos, que aumenta el ancho de los dedos, lo que conlleva cambios en el tamaño del zapato, el guante y el anillo [29]. La osteoartritis y la hiperlaxitud articular también pueden contribuir a las deformidades de las manos.

- Cambios orofaciales: Los rasgos faciales incluyen prognatismo frontal, agrandamiento de la nariz y las orejas, engrosamiento de los labios, arrugas de la piel y pliegues nasolabiales, así como prognatismo mandibular que conduce a una maloclusión dental y a un mayor espaciamiento interdental. La macroglosia es un hallazgo frecuente y contribuye a la aparición de apnea obstructiva del sueño. La voz más grave se debe a la hipertrofia laríngea y a los senos paranasales agrandados.

- Cambios en la piel y en los apéndices: Los cambios profundos en la piel son característicos de la acromegalia y contribuyen a las deformidades faciales y de partes acras. La hinchazón de la piel es más prominente en la cara, las manos y los pies, y aparece en pacientes con acromegalia de larga duración. Se debe al depósito de glicosaminoglicanos, aumento de la producción de colágeno en el tejido colectivo y al edema [29, 37]. Las arrugas faciales de la piel, los pliegues nasolabiales y las almohadillas del talón se vuelven más gruesas. El aumento de las glándulas sebáceas favorece la hiperhidrosis y la piel grasa, que son signos tempranos comunes, pues aparecen hasta en el 70% de los pacientes [29]. Las marcas cutáneas son comunes y pueden ser marcadores de pólipos colónicos adenomatosos. También se caracteriza por la acantosis nigricans, debido a la resistencia a la insulina. El fenómeno de Raynaud aparece en un tercio de los pacientes, debido a la alteración en los capilares de la piel, que producen vasoconstricción [37]. El hirsutismo y la hipertrichosis también son frecuentes.

- Rasgos musculoesqueléticos: La artropatía acromegálica puede afectar hasta el 84% de los casos, especialmente a pacientes mayores o mujeres, puede afectar a cualquier articulación [38, 39]. La mayoría de los pacientes presentan hinchazón de las articulaciones, hipermovilidad y engrosamiento cartilaginoso. Hasta la mitad puede experimentar síntomas en las articulaciones lo suficientemente graves como para limitar sus actividades diarias [29, 40]. La acromegalia también puede estar asociada con un mayor riesgo de fracturas por compresión vertebral a pesar de la densidad ósea normal, y el hipogonadismo puede acelerar el riesgo de fractura [33, 40]. La neuropatía periférica con alteración sensorial en manos y pies están presentes con frecuencia, el síndrome del túnel carpiano aparece en el 20 a 64% de los pacientes debido a agrandamiento neural e hinchazón del tejido de la muñeca [41, 42]. La osteoartritis puede ocasionar remodelación ósea, formación de osteofitos, quistes subcondrales, espacios articulares

estrechados y laxitud del ligamento periarticular [29]. El dolor musculoesquelético es extremadamente frecuente y afecta negativamente la calidad de vida [42, 43].

- Comorbilidades respiratorias: La obstrucción de la vía aérea superior, debida a la macroglosia, prognatismo, labios gruesos y la hipertrofia de la mucosa laríngea y el cartílago, puede provocar ronquidos y apnea del sueño, así como una intubación difícil en el momento de la cirugía [41, 44, 45]. La apnea del sueño afecta entre un 20 y un 87% de los pacientes [46], siendo más frecuente en personas con diabetes o hipertensión. La mayoría de los casos tienen apnea obstructiva del sueño (mediada por el crecimiento de los tejidos blandos alrededor de las vías respiratorias superiores), mientras que una minoría de los casos tiene apnea central pura o apnea mixta [44]. La hipoventilación y la hipoxemia también pueden ocurrir debido a la depresión respiratoria central y la cifoescoliosis [43].

- Complicaciones metabólicas: El exceso de GH se asocia con resistencia a la insulina (en el hígado y en la periferia), aumento de la gluconeogénesis y lipólisis y disminución de la captación periférica de glucosa [44, 45]. Por ello, la acromegalia se asocia a intolerancia a la glucosa (40-52% de los casos), diabetes mellitus (28-46%) y dislipemia (particularmente hipertrigliceridemia, elevación de lipoproteína- A y un exceso de partículas pequeñas y densas de LDL) [44, 47, 48].

- Complicaciones cardiovasculares: La acromegalia se asocia con una alta prevalencia de hipertensión [29, 45, 49]. Las valvulopatías (especialmente la insuficiencia aórtica o mitral), las arritmias y los trastornos de la conducción también son frecuentes [33]. Además, el exceso de GH e IGF-1 puede inducir una miocardiopatía específica caracterizada por hipertrofia concéntrica (que afecta predominantemente al ventrículo izquierdo), disfunción diastólica y disfunción sistólica progresiva que finalmente conduce a insuficiencia cardíaca [44, 45, 50]. La hipertrofia ventricular izquierda (HVI) se describía en el 60% de los pacientes usando ecocardiografía [45], sin embargo, con resonancia magnética cardíaca baja al 5-31% [51]. Si la enfermedad cardíaca está presente en el momento del diagnóstico, hay una tasa de mortalidad del 100% en 15 años [45]. Curiosamente, la prevalencia de enfermedad coronaria no está claramente aumentada en pacientes acromegálicos [33, 45].



- Cambios neuropsicológicos: Como consecuencia de las múltiples comorbilidades y los cambios somáticos, los pacientes acromegálicos tienen una calidad de vida severamente dañada [42]. Además, se caracterizan por una serie de cambios emocionales y psicológicos en estas personas que incluyen alteraciones en la personalidad debido a una autoestima alterada, distorsión de la imagen corporal, trastornos en las relaciones interpersonales y retraimiento social, así como problemas cognitivos, ansiedad y depresión [33, 52].

- Trastornos neurológicos Algunos estudios han mostrado un mayor riesgo de cefalea, discapacidad visual, aneurismas intracraneales [53], hernia de las amígdalas cerebelosas [54], pérdida auditiva [55] y apoplejía hipofisaria [56, 57]. Esto último puede resultar en la remisión espontánea de la acromegalia debido a la destrucción completa del tumor [57].

- Complicaciones neoplásicas Presumiblemente debido al efecto estimulador del IGF-1 en la tumorigénesis, la acromegalia se ha asociado con un mayor riesgo de ciertos tumores [44, 45]. Los datos mejor documentados son los relativos a la neoplasia colorrectal. El odds ratio (OR) combinado aumenta tanto para los tumores benignos (2,48 para los adenomas y 3,557 para los pólipos hiperplásicos) como para el cáncer de colon (2,04–4,351) [44, 58]. La tasa de mortalidad estandarizada (SMR) para el cáncer de colon también demostró ser más alta en la acromegalia activa (2,47) en comparación con la población general.

El riesgo de enfermedad nodular tiroidea y cáncer de tiroides también aumenta en la acromegalia con OR de 6,9 y 7,5 respectivamente [44, 59]. En estudios multicéntricos, el 54% de los sujetos tenía nódulos tiroideos (aproximadamente el 25% con nódulos tóxicos), 18 a 20% con bocio difuso y 1,2 a 7,2% con cáncer de tiroides (en particular, carcinomas papilares) [33, 59-61]. En los últimos años, el cáncer de tiroides ha sido uno de los cánceres más comúnmente detectados en acromegalia [33, 61, 62]. Sin embargo, todavía es controvertido si esto refleja un efecto específico del exceso de GH / IGF-1 o la mayor disponibilidad de técnicas de diagnóstico precisas [44, 62].

## D- Diagnóstico

### D.1 Diagnóstico bioquímico

El diagnóstico bioquímico de acromegalia requiere la demostración de concentraciones elevadas de GH e IGF-1. Un valor elevado de GH, aislado, no implica su diagnóstico, ya que su secreción es pulsátil [63]. Sin embargo, un valor al azar de GH inferior a 0,04 ng/L excluye la presencia de esta enfermedad. El diagnóstico se basa en la medición de IGF-1 basal y en la valoración de la capacidad de supresión de la GH sérica tras una sobrecarga oral de glucosa (SOG) con 75 gramos. Así, el exceso de IGF-1 respecto a unos valores de referencia para la edad y sexo, y la falta de supresión de GH tras SOG confirman el diagnóstico. Tras la SOG, los valores nadir de GH por debajo de 1 ng/L con la mayoría de los métodos, descartan la acromegalia. Sin embargo, si se emplean métodos ultrasensibles de determinación de GH, el criterio de supresión es una concentración de GH circulante igual o menor de 0,4 ng/L [11, 64, 65].

### D.2 Diagnóstico de imagen

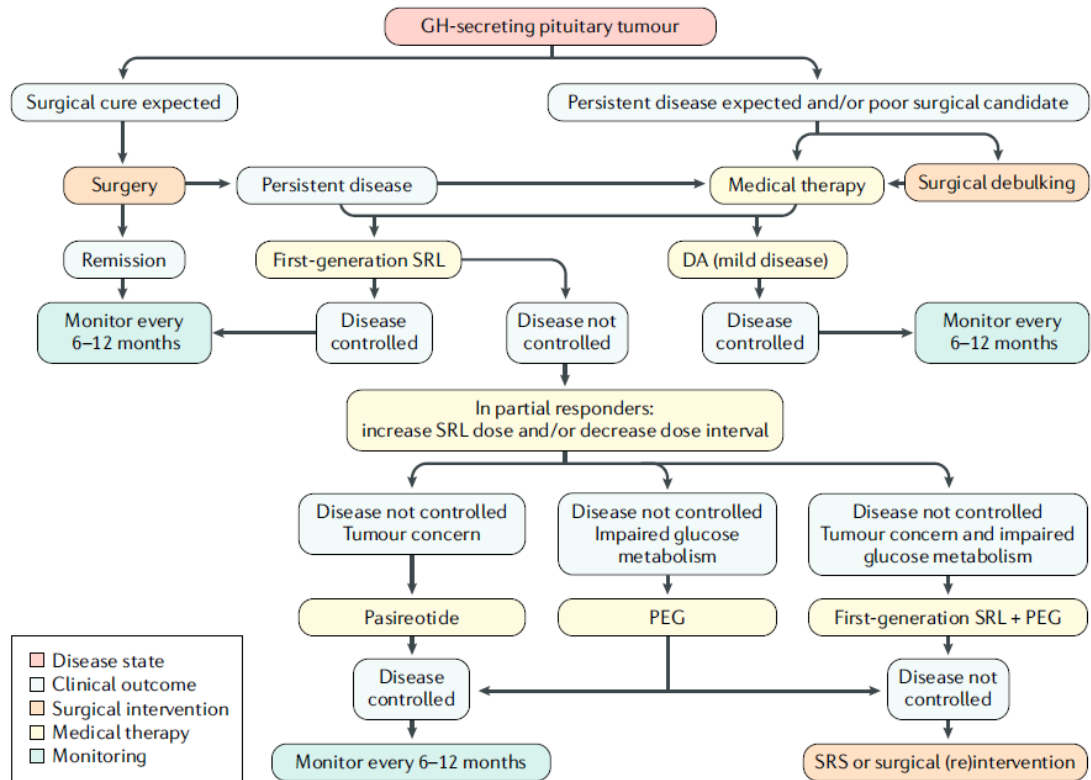
La resonancia magnética nuclear (RMN) hipofisaria con administración de gadolinio es la mejor técnica de imagen para localizar el origen del exceso de GH. En el momento del diagnóstico, más de un 75% de los pacientes presentan un macroadenoma (diámetro del tumor mayor de 10 mm). La RMN ha mejorado mucho su resolución en los últimos años y es una parte fundamental del diagnóstico de los pacientes con acromegalia. Es una prueba no invasiva que puede ayudar a caracterizar estos adenomas secretores de GH y a predecir su comportamiento clínico. Algunos estudios previos sugieren que existe una relación entre la intensidad en T2 del adenoma y sus características [66], patología [66-68] y respuesta al tratamiento con análogos de somatostatina (SSA) [67]. Sin embargo, estos estudios se han realizado en series pequeñas y sus resultados no son consistentes. Esta falta de concordancia se puede deber a que a diferencia de otros tipos de adenomas hipofisarios que suelen ser hiperintensos en la señal en T2 de la RMN, como los prolactinomas [66], la señal en T2 de los adenomas secretores de GH es

variable. La causa de esta variabilidad en la intensidad en T2 no se conoce, quizás debido a que muchos de los estudios publicados no tienen imágenes en T2 o son de mala calidad [69].

## **E- Tratamiento**

Los enfoques para el tratamiento de la acromegalia incluyen cirugía, radioterapia y terapia médica [70]. El tratamiento de la acromegalia tiene como objetivo normalizar los niveles de GH e IGF-1, controlar la masa tumoral, disminuir el riesgo de desarrollar comorbilidades sistémicas, lo que reduce la mortalidad y mejora o normaliza la calidad de vida [33, 71]. Con el tiempo, las directrices internacionales y las declaraciones de consenso con respecto al manejo de la acromegalia han cambiado sustancialmente, debido a un mejor conocimiento de la enfermedad, mejores ensayos de GH e IGF-1, y la disponibilidad de nuevas opciones de tratamiento, lo que resulta en un progreso hacia un tratamiento cada vez más "personalizado" [30, 33, 72]. Una opción de tratamiento es la que se muestra en la figura 5 [70].

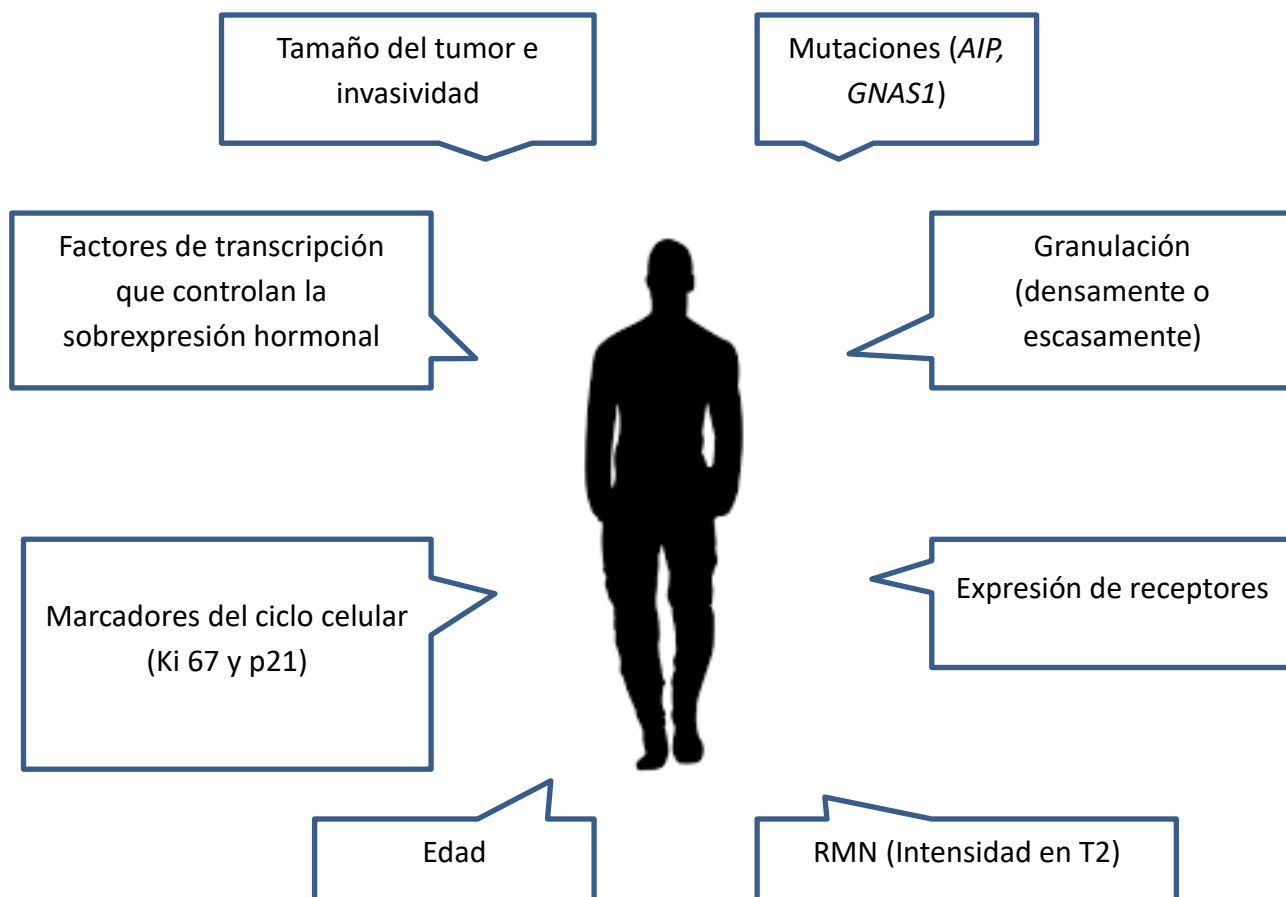
El tratamiento personalizado permite la optimización de la terapia en función de las características del paciente, la evolución de la enfermedad y la respuesta a tratamientos específicos (Figura 6), lo que mejora la atención y el resultado del paciente [12, 73]. Además, la clasificación de la OMS de 2017 de tumores hipofisarios reconoce el papel de distintos marcadores inmunohistoquímicos en la mejora de la clasificación de los adenomas hipofisarios agresivos [74]. Insisten en la importancia de la evaluación del potencial proliferativo del tumor (por recuento mitótico e índice Ki67) y otros parámetros clínicos, como la invasión del tumor. La nueva clasificación también reconoce algunos subtipos del tumor neuroendocrino hipofisario, como el adenoma somatotropo escasamente granulado, como adenomas hipofisarios de alto riesgo en función de su comportamiento clínicamente agresivo[74].



**Figura 5.** Algoritmo de tratamiento en la acromegalia [74].

La cirugía transesfenoidal es la primera línea de tratamiento en la mayoría de los pacientes, excepto en aquellos con alto riesgo quirúrgico, en los que se niegan a la cirugía o en los que el tumor es muy invasivo y poco resecable. En este grupo de pacientes, el tratamiento médico representa una alternativa a la cirugía. Los análogos de somatostatina de primera generación son la primera línea de tratamiento médico para la mayoría de los pacientes. En aquellos que respondan parcialmente, estaría indicado aumentar la dosis o frecuencia. Si no se consigue un control de la enfermedad, estaría indicado usar los análogos de somatostatina de segunda generación, sobre todo en aquellos con un resto tumoral grande. Pegvisomant es mejor alternativa en aquellos con alteración hidrocarbonada. Se indica terapia combinada con análogos de la somatostatina de primera generación y Pegvisomant en pacientes con tolerancia a la glucosa alterada y resto tumoral importante. En pacientes en los que la enfermedad no se controla a pesar de la terapia médica de segunda línea, la radiocirugía estereotáxica o la intervención o reintervención quirúrgica deben considerarse. En pacientes con elevaciones discretas de la IGF-1 los análogos de la dopamina son una opción. (DA: agonista de la dopamina; GH: hormona del crecimiento; SRS: radiocirugía estereotáxica; PEG: pegvisomant; SRL: análogos de la somatostatina). Tomado de Colao *et al.* [74]

Por todo esto, el manejo óptimo del paciente con acromegalia debe hacerse por un equipo multidisciplinar, que incluya un especialista en endocrinología, neurocirugía, neuroradiología y radioterapia con experiencia en tumores hipofisarios. También un anatomopatólogo experto en análisis histopatológico que incluya el análisis de hormonas hipofisarias y marcadores de proliferación.



**Figura 6.** Manejo personalizado de la acromegalia. Modificado de Colao *et al.* [74].

Un acercamiento personalizado para el manejo de la acromegalia supone integrar varios datos, incluyendo las características del paciente (como la edad), el tamaño y la invasividad del tumor, los factores de transcripción que median la sobreexpresión hormonal en las células mutadas, las características de la resonancia magnética en T2, la expresión de receptores específicos que podrían influir en la respuesta a terapias médicas (como los receptores de somatostatina SST<sub>2</sub> y SST<sub>5</sub> y dopamina D2) y de las proteínas del ciclo celular y la abundancia de gránulos hormonales. Esta información debe permitir la optimización de la terapia, mejorando así la atención y los resultados del paciente y reduciendo los costes económicos. (RMN: resonancia magnética nuclear; SST<sub>2</sub>: receptor de somatostatina subtipo 2, SST<sub>5</sub>: receptor de somatostatina subtipo 5; D2: receptor de dopamina tipo 2).

La acromegalia no tratada se asocia con una reducción de la esperanza de vida. Los pacientes con acromegalia activa presentan una tasa de mortalidad estandarizada dos veces superior a la normal. La muerte se debe principalmente a enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y respiratorias, y, en algunos estudios, a un aumento de neoplasias, fundamentalmente gastrointestinales [75]. Las complicaciones cardiovasculares son las más frecuentes, y suponen hasta el 60% de las muertes. Si está presente en el momento del diagnóstico, la enfermedad cardíaca conduce a una tasa de muerte del 100% en 15 años[45]. La mortalidad por causas respiratorias, como síndrome

de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño, la hipoventilación, la hipoxia y las infecciones pulmonares representan el 25% de los casos [45], mientras que las enfermedades malignas son responsables de aproximadamente entre el 15% y el 24% de las muertes [76].

La mortalidad asociada con la acromegalia es reversible si se reducen los niveles de GH por debajo de 2-2,5 ng/L [7], y en algunos estudios si se normalizan los niveles de IGF-1 en intervalos de referencia específicos para la edad y sexo. En el metaanálisis de Holdaway *et al.* [77] que se centra en la relación entre las mediciones bioquímicas y la mortalidad durante el seguimiento de la acromegalia, la mortalidad fue cercana al nivel esperado en los pacientes con GH por debajo de 2,5 ng/L (tasa de mortalidad estandarizada 1,1 IC 0,9 - 1,4 95 %); Sin embargo, fue significativamente alta en los pacientes con GH por encima de 2,5 ng/L (tasa de mortalidad estandarizada 1,9 IC 1,5 - 2,4 95 %) [75, 78, 79]. Distintos estudios epidemiológicos han investigado la elevación de IGF-1 como predictor de mayor mortalidad, aunque aún es un tema controvertido [79, 80]. En la última década, sin embargo, algunos estudios han publicado la normalización de las tasas de mortalidad con el abordaje quirúrgico y los nuevos fármacos [81, 82], mientras que otros siguen encontrando un aumento de la mortalidad [83, 84]. En el metaanálisis de Bolfi *et al.* [85] se objetivó que la mortalidad en la acromegalia está fuertemente relacionada con el control de la enfermedad.

### E-1 Cirugía

El tratamiento de elección de la acromegalia sigue siendo el quirúrgico, consiguiendo unos índices de remisión del 80-90% en pacientes con microadenomas (diámetro tumoral menor de 10mm) productores de GH y del 50% de los macroadenomas. En el estudio REA, la curación quirúrgica definida como IGF-1 normal tras la cirugía sin necesidad de tratamiento médico concomitante, fue del 32 % [86], mucho más baja de la publicada por cirujanos [87, 88], en las que en algunas series muestran tasas de curación entre el 50 y el 80 %, siempre superiores en microadenomas que en macroadenomas. En concreto, la cirugía es el procedimiento de elección en

microadenomas, macroadenomas con síntomas compresivos y macroadenomas subsidiarios de curación quirúrgica. También puede ser el tratamiento de elección en macroadenomas no subsidiarios de curación, a fin de disminuir el tamaño tumoral y facilitar la respuesta al tratamiento complementario [28, 89]. En el caso de no existir imagen de tumor en la RMN, la ausencia de un grupo de neurocirujanos expertos en cirugía hipofisaria o si el tumor invade el seno cavernoso y/o el riesgo quirúrgico del paciente es muy alto, el tratamiento médico podría ser la primera opción a tener en cuenta [89, 90].

La cirugía es la única opción que permite conseguir un diagnóstico anatomopatológico de la pieza tumoral. La distinción anatomopatológica entre los distintos tipos de tumores secretores de GH puede tener importancia en la respuesta al tratamiento y en el pronóstico. Se pueden diferenciar entre los tumores productores de GH, los tumores mixtos productores de GH y prolactina y los adenomas productores de GH silentes. Estos últimos son tumores con inmunohistoquímica positiva para GH, sin manifestaciones clínicas de exceso de GH, los cuales pueden tener un comportamiento agresivo y ser subsidiarios de tratamiento médico.

También se pueden medir la expresión de citoqueratinas de bajo peso molecular, en particular las 8 y 18 (identificadas como CK8 y CK7), para identificar los dos subtipos principales de somatotropinomas. Un patrón perinuclear difuso de citoqueratinas es diagnóstico de somatotropinoma densamente granulado, mientras que un patrón en gota con un porcentaje de cuerpos fibrosos mayor del 70% identifica un somatotropinoma escasamente granulado [4]. Es importante distinguirlos porque los densamente granulados tienen mejor respuesta a los análogos de la somatostatina de primera generación [91].

En la pieza quirúrgica obtenida se pueden estudiar marcadores tumorales como el gen transformante de tumor hipofisario (PTTG) y el marcador de proliferación celular Ki-67. Concretamente, PTTG se expresa abundantemente en los adenomas hipofisarios y se correlaciona con la invasividad del tumor y la recurrencia [20]. El Ki-67 es un antígeno proteico nuclear expresado en todo el ciclo celular; es un marcador de la actividad

proliferativa. Su expresión es directamente proporcional al tamaño, a la capacidad de invasión y a la recidiva de adenomas [92]. También se puede determinar la presencia y abundancia de distintos receptores hormonales como los de somatostatina (SST<sub>1</sub>-SST<sub>5</sub>), dopamina (DR), ghrelina (GHSR1a) o vasopresina (AVPR1b). Estudios recientes han demostrado que la determinación de E-cadherina permite identificar con mayor precisión que los SST la respuesta a SSA, sin embargo, los algoritmos de tratamiento de la acromegalia no los contemplan, por lo que su determinación está relegada a la investigación.

## E-2 Tratamiento médico

La terapia médica tiene un papel importante en el tratamiento de la acromegalia, ya sea como tratamiento de primera línea como alternativa a la cirugía o como tratamiento de segunda línea [93-95]. Existen principalmente tres grupos de fármacos que podrían ser utilizados personalmente en el tratamiento de la acromegalia basándose en el perfil molecular del tumor: análogos de somatostatina (SSA), agonistas dopaminérgicos (DA) y antagonistas periféricos del receptor de GH (GHRA) [90]. Los SSA de primera generación (octreótida y lanreótida) son la terapia médica de primera línea en la mayoría de los pacientes con acromegalia, existiendo también SSA de segunda generación, pasireótida, [33], así como alternativas terapéuticas adicionales, incluidos los DA y el antagonista del receptor de GH pegvisomant (PEG).

El tratamiento médico con SSA en la acromegalia puede iniciarse cuando, 3 meses tras la cirugía, las concentraciones de GH en suero no se reducen a 1 µg/L o menos, tras la SOG 75 g [96]. No se recomienda el uso rutinario de SSA preoperatorios antes de la cirugía de los adenomas hipofisarios; sin embargo, cuando el tratamiento quirúrgico no está disponible o el paciente lo rechaza, el tratamiento médico puede considerarse como terapia de primera línea [96].

Los DA tienen una función limitada y se utilizan principalmente como tratamiento médico de primera línea en pacientes con niveles de GH e IGF-1 levemente elevados o



se usan en combinación con SSA de primera generación en pacientes que son parcialmente resistentes a los SSA [97, 98]. PEG está indicado después de una cirugía fallida y/o resistencia al tratamiento con SSA, ya sea como monoterapia o en combinación con SSA [99], mientras que pasireótida está indicada cuando la cirugía no es exitosa o no es una opción y cuando el tratamiento con SSA de primera generación no es eficaz para controlar acromegalia, especialmente en pacientes con tumor residual clínicamente relevante y/o preocupación clínica por el crecimiento del tumor [100-102] (Figura 7).

Cabe destacar que el tratamiento médico ha modificado la secuencia terapéutica en algunos casos en los últimos años, fundamentalmente debido a la disponibilidad de los SSA de acción prolongada.

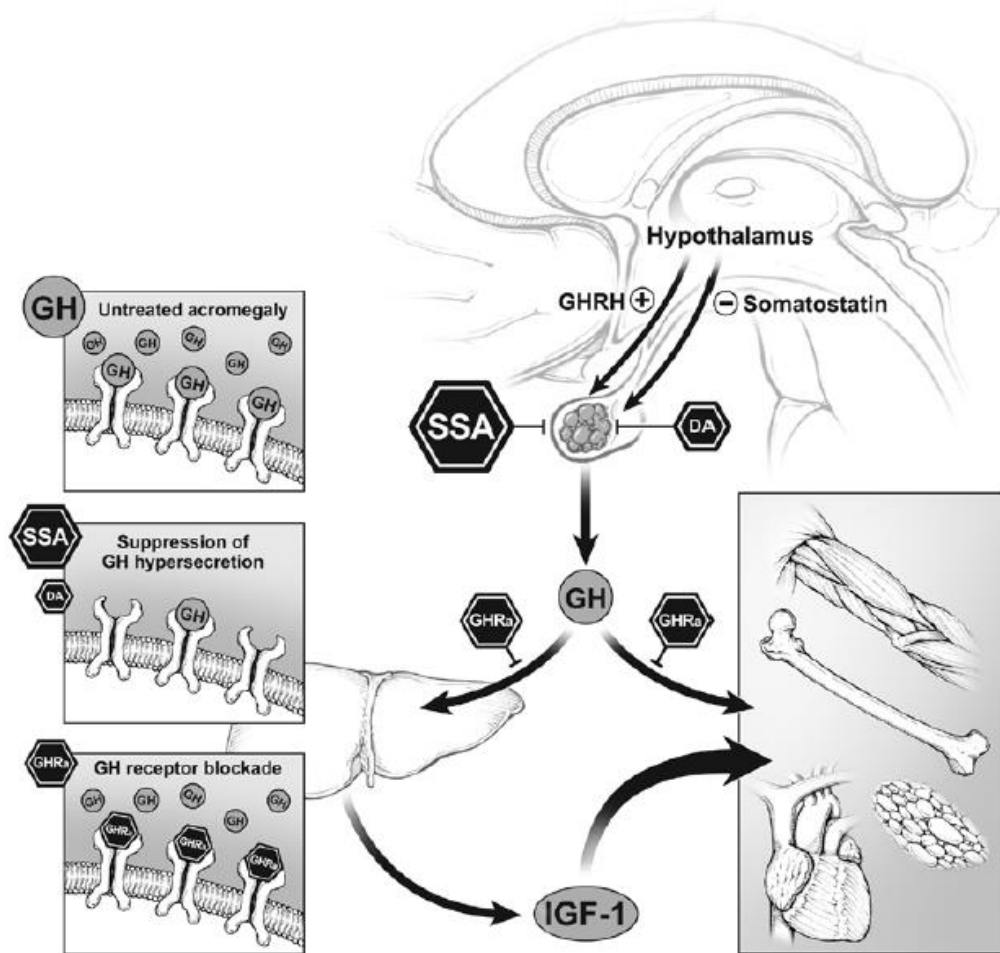
Como hemos explicado anteriormente, la secreción de GH está controlada por distintos factores estimuladores e inhibidores. Dentro del primer grupo se incluye la GHRH y la ghrelina entre otros. Dentro del grupo de factores inhibidores destacan la somatostatina y el IGF-1 [103]. La somatostatina es un péptido cíclico de 14 aminoácidos que está implicado en el crecimiento, el desarrollo, el metabolismo, y los procesos reproductivos y que, como se mencionó anteriormente, actúa a través de su unión a cinco receptores específicos (SST<sub>1</sub>-SST<sub>5</sub>) [104-106]. Los SSA (octreótida, lanreótida y pasireótida) inhiben la secreción de GH mediante la unión a uno o varios SSTs. En la adenohipófisis normal se expresan todos los subtipos excepto el SST<sub>4</sub> [105, 107]. En este sentido, cabe destacar que se ha observado un cambio en la expresión de SSTs en los adenomas hipofisarios, en los que el patrón de expresión concreto depende del tipo de tumor generado. SST<sub>2</sub> y SST<sub>5</sub> son los subtipos predominantes (90-95%) en los tumores secretores de GH [108]. La expresión y abundancia relativa de SSTs tiene una potencial importancia clínica como predictores clínicos de respuesta al tratamiento con SSA [108, 109] ya que octreótida y lanreótida se unen fundamentalmente a SST<sub>2</sub>. De hecho, los efectos de supresión de GH mediados por estos fármacos están correlacionados positivamente con los niveles de expresión de SST<sub>2</sub> [109].

Octreótida se administra por inyección subcutánea o intravenosa. La afinidad de octreótida por SST<sub>2</sub> es 45 veces mayor que la de la somatostatina endógena. Sus concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan 40 minutos después de la administración, y la vida media es de aproximadamente 2 horas [20], lo que hace que se tuviera que poner varias veces al día. Octreótida LAR, en la que se mezcla octreótida con un diluyente (carboximetilcelulosa sódica, manitol, agua) y microesferas de polímero de glucosa biodegradable [110] se administra mediante inyección intramuscular y las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan dentro de la primera hora de la administración [27]. Octreótida LAR se libera de manera bifásica, de modo que la concentración plasmática disminuye en las 12 horas posteriores a la administración, permanece en niveles sub-terapéuticos durante aproximadamente 7 días y luego aumenta para alcanzar su concentración máxima el día 14 después de la inyección [96]. Dado que las concentraciones plasmáticas permanecen elevadas durante aproximadamente 35 a 60 días y disminuyen gradualmente, octreótida LAR se administra cada 4 semanas, y las concentraciones plasmáticas alcanzan un estado estable después de tres inyecciones [28].

Lanreótida con el tipo de liberación sostenida (SR) es otro análogo de la somatostatina formulado como un copolímero de lactida / glicolida biodegradable con alta afinidad por el SST<sub>2</sub> y una vida media de aproximadamente 5 días. Lanreótida SR se administra mediante inyección subcutánea profunda en una dosis de 30 o 60 mg cada 7 a 14 días [20]. Su vida media es de aproximadamente 23 a 29 días y alcanza su estado estable después de cuatro inyecciones [20].

Dado que distintos estudios pusieron de manifiesto la expresión de SST<sub>5</sub> en células tumorales de adenoma hipofisario productor de GH y las relaciones significativas entre la expresión de SST<sub>5</sub> y la actividad de la enfermedad en los tumores hipofisarios secretores de GH [109], se desarrolló el análogo de la somatostatina de segunda generación con mayor afinidad por SST<sub>5</sub>: pasireótida. Pasireótida tiene 40, 30 y 5 veces mayor afinidad de unión para SST<sub>5</sub>, SST<sub>1</sub> y SST<sub>3</sub>, respectivamente, que octreótida o lanreótida, y aproximadamente 2,5 veces menor afinidad para SST<sub>2</sub>, por lo que a menudo se refiere como un SSA pan-receptor [111]. Las concentraciones plasmáticas de pasireótida LAR alcanzan un máximo inicial 24 horas después de la administración, y la

concentración disminuye durante los siguientes 7 días y luego aumenta nuevamente hasta alcanzar un segundo máximo el día 21 después de la inyección [112]



**Figura 7.** Terapia médica en la acromegalia. Los SSA inhiben directamente la secreción de GH, por lo que controlan niveles de GH e IGF-1. Los agonistas dopaminérgicos reducen la hipersecreción de GH, y los inhibidores periféricos de la GH bloquean la liberación periférica de IGF-1 dependiente de GH. (SSA: análogos de somatostatina; GH: hormona de crecimiento; IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1) [90].

Los SSA pueden ser particularmente efectivos en el control del tamaño tumoral y actividad bioquímica en adenomas productores de GH. De hecho, el tamaño del tumor se reduce un 20 % en el 70 % de los pacientes tratados con octreótida -LAR, en el 50% de los pacientes que reciben lanreótida (60 mg) y en el 25 % de los que son tratados con lanreótida (30 mg). Sin embargo, la reducción del tamaño del tumor hipofisario con SSA se limita a un subconjunto de pacientes, aproximadamente el 40 % [113, 114]. Este

efecto parece estar relacionado con el tratamiento previo del paciente, pues la disminución del tamaño del tumor es mayor cuando este tratamiento médico se administra como terapia inicial [114]. La respuesta a SSA en el postoperatorio es variable y depende fundamentalmente de la expresión de SSTs.

Octreótida - LAR y lanreótida reducen la hipertrofia ventricular mejorando la disfunción diastólica, la apnea obstructiva del sueño y el perfil lipídico. Además, mejoran los síntomas como cefalea, fatiga, síndrome de túnel del carpo y reducción de los tejidos blandos. Por desgracia, la resistencia a SSA se observa en alrededor de un tercio de los tumores y podría estar relacionada con la reducción de los niveles de expresión de diferentes SSTs. Por ello, la selección del SSA a usar podría beneficiarse de un conocimiento del perfil de SSTs presente en la pieza quirúrgica.

Por su lado, la dopamina reduce la hipersecreción de GH en muchos pacientes con acromegalia [97] y los DA (bromocriptina y cabergolina) pueden reducir la secreción hormonal y el tamaño en los adenomas hipofisarios. Los DA estarían indicados en los pacientes con una discreta elevación de IGF-1 (IGF-1 menos de dos veces el nivel superior límite del rango normal ajustado por edad) y en los tumores mixtos que producen GH y prolactina. De hecho, un metaanálisis concluye que la cabergolina en monoterapia consigue una normalización de IGF-1 en un tercio de los pacientes analizados, con datos limitados sobre disminución del tamaño tumoral [98]. Sin embargo, la relación entre la respuesta terapéutica y la expresión de receptores de dopamina es compleja, debido a que los receptores de dopamina están codificados por 5 genes distintos (DR1-5) [115]. Además, existen dos variantes del subtipo DR2 [DR2 largo (DR2L)] y DR2 corto (DR2s) [116]. DR2 y DR4 se expresan en la hipófisis normal [115, 117] y los niveles de DR2 se han correlacionado positivamente con la supresión de prolactina y de GH inducida por DA en pacientes con somatotropinomas [118].

Cabe destacar que se ha demostrado que, en humanos, DR2 puede formar heterodímeros con varios SSTs, fundamentalmente con SST<sub>2</sub> y SST<sub>5</sub>, y que la composición específica de estos heterodímeros pueden alterar la respuesta a DA y SSA [119]. Esta posible relación entre DR y SSTs ha impulsado el desarrollo de agonistas quiméricos

DR2/ SST<sub>2</sub>/ SST<sub>5</sub> para el uso terapéutico [119, 120]. Todo ello sugiere que el éxito del tratamiento de los adenomas hipofisarios con DA y SSA puede depender del patrón de expresión de los distintos subtipos de receptores de dopamina y somatostatina. En distintos estudios se ha encontrado una correlación directa entre la expresión de receptores SST<sub>2</sub> y la reducción del tamaño del tumor; en los que el mayor ratio SST<sub>2</sub> / SST<sub>5</sub> se observó en pacientes en los que se consiguió un control hormonal [109, 121]. Además, *in vitro*, la respuesta a octreótida es mejor en aquellos adenomas que expresan niveles altos de DR2 [118, 122]. En algunos pacientes en los que no se consigue una respuesta adecuada podría plantearse la combinación de los distintos fármacos. La combinación de SSA de primera generación y cabergolina está indicada en pacientes que son parcialmente resistentes a los SSA y la adición de DA normaliza los niveles de IGF-1 en más del 50% de pacientes [74]. En general, los tratamientos combinados consiguen una mayor efectividad y pueden hacer disminuir las dosis y, por tanto, la toxicidad [12, 123].

Según la guía de práctica clínica de la sociedad de endocrinos norteamericanos [33], el antagonista del receptor de GH PEG está indicado como terapia de segunda o tercera línea, en su mayoría en pacientes en los que ha fracasado la cirugía o en aquellos que muestran una mala respuesta a los SSA de primera línea. En pacientes que responden parcialmente a los SSA, se puede considerar la combinación de PEG y SSA, mientras que en pacientes con acromegalia resistente a SSA, se puede pasar a monoterapia con PEG [124]. La monoterapia con PEG normaliza los niveles de IGF-1 en aproximadamente el 90% de los pacientes en ensayos clínicos y más cerca del 60% de los pacientes en estudios del mundo real, probablemente debido a las diferencias en la dosificación. También se observa un aumento de su eficacia cuando se usa PEG en combinación con un SSA [124]. Los predictores de respuesta a la terapia con PEG incluyen edad, sexo, IMC y niveles de GH o IGF-1. En consecuencia, los pacientes jóvenes, varones u obesos podrían necesitar dosis más altas de PEG que otros pacientes para normalizarse niveles de GH [33].

### E-3 Radioterapia

La radioterapia debe ser considerada en el manejo de pacientes con adenomas hipofisarios, particularmente cuando fracasa el tratamiento médico y quirúrgico. Debido al inicio de respuesta lento y la frecuencia de hipopituitarismo secundario, es importante el seguimiento estrecho de los pacientes por si precisaran tratamiento sustitutivo [125]. La radioterapia convencional permite un control tumoral en el 90-97% de los casos con una supervivencia libre de progresión del 75-90% a 20 años[126]. Sin embargo, el riesgo de hipopituitarismo está en torno al 30-88%, lo cual conlleva la necesidad de tratamiento sustitutivo de por vida, deterioro de la calidad de vida y aumento de la mortalidad por causas respiratorias, cerebrovasculares y cardiovasculares [127]. La radioterapia estereotáxica es una técnica no invasiva consistente en la administración de una alta dosis de radiación delimitada a una lesión intracraneal objetivo mediante un sistema de localización tridimensional. Esta técnica es compatible tanto para la administración de una única dosis como fraccionada [128]. Dentro de los distintos tipos de radiocirugía (RC) aplicados a tumores hipofisarios encontramos la Gamma Knife y los sistemas que utilizan aceleradores lineares, incluyendo la RC Cyberknife.

Parece que los tumores hipofisarios previamente tratados con SSA responden menos a la RC, si bien esta hipótesis solamente ha sido confirmada en algunos estudios a largo plazo [129, 130]. Así mismo hubo tendencia a la significación respecto a volumen tumoral y retirada de tratamiento con SSA. Para muchos autores el mejor criterio de buena respuesta al tratamiento está en la definición del objetivo a tratar en la RMN.

Las guías de práctica clínica establecen distintos algoritmos de tratamiento en el manejo de pacientes con acromegalia y el perfil de paciente que debe ser tratado con RC. De esta forma la RC debe ser usada en pacientes que presenten un volumen tumoral relativamente pequeño, bien definido en la RMN, lo suficientemente lejos del quiasma óptico como para evitar la neuritis producida por la radiación y a ser posible no tratados previamente con radioterapia (o en caso de serlo, considerar el aumento de efectos adversos y/o necesidad de disminuir la dosis, lo que implica menor posibilidad de remisión).

## F. Seguimiento

El seguimiento de los pacientes con acromegalia debe realizarse en función del grado de control de la enfermedad. Se considera que la acromegalia está controlada cuando no existe clínica, cuando la GH al azar es inferior a 2,5 ng/ml, los niveles de IGF-I son normales para la edad y el sexo, y la supresión de GH tras una SOG es inferior a 1 o 0,4 ng/ml según el método utilizado [74]. En la acromegalia curada tras cirugía, se realizan determinaciones seriadas de las concentraciones de GH e IGF-1. Si hubiese criterios de recidiva, se realizaría una SOG para confirmar la recidiva. Aquellos pacientes controlados con tratamiento médico, que están con SSA se monitorizan con determinaciones de GH e IGF-1. La RMN se realiza a los 3 o 4 meses de la cirugía y a los 3 o 4 meses del inicio del tratamiento médico.

El control de la enfermedad definido mediante la normalización de los valores bioquímicos no siempre coincide con los síntomas relacionados con la enfermedad o con la calidad de vida percibida (CdV) por el paciente. De hecho, la acromegalia se ha asociado a una reducción de esta [131]. La evaluación de la calidad de vida ofrece información sobre el punto de vista del paciente con respecto a cuestiones que son importantes para su vida cotidiana. Es un concepto que se refiere a la salud física, estado psicológico y nivel de independencia de la persona y refleja los efectos de una enfermedad y su tratamiento. Está influenciada por los objetivos, expectativas, estándares, preocupaciones y contexto cultural y social del paciente, así como por los acontecimientos de la vida. La calidad de vida es hoy en día un criterio de valoración en la evaluación de pacientes con acromegalia y se puede medir con cuestionarios diseñados para ser utilizados en la población general o en cualquier tipo de enfermedad [cuestionarios genéricos como el Perfil de Salud de Nottingham (NHP), la escala de bienestar general psicológica (PGWBS) o el EuroQoL]; o cuestionarios específicos para medir la calidad de vida en pacientes con acromegalia (AcroQoL) [132]. Este último está constituido por 22 preguntas e incluye dos puntos de análisis: psicológico (14 preguntas) y físico (8 preguntas). El primero se subdivide en dos dominios: apariencia y relaciones interpersonales. [133]

Muchos de los estudios que han empleado el AcroQoL como herramienta de evaluación, han confirmado un deterioro severo de la calidad de vida de los pacientes y han encontrado que los factores que se han asociado a una peor calidad de vida son: enfermedad activa, género femenino, edad, duración de la enfermedad, los síntomas articulares y el uso previo de radioterapia [42, 133].

En el metaanálisis de Geraedts *et al.*, se mostró que, en cohortes heterogéneas de pacientes con acromegalia con enfermedad activa y controlada, los factores generales que tuvieron un efecto negativo en la calidad de vida en pacientes con acromegalia fueron la depresión y un IMC más alto. Se considera que estos factores están asociados con una CdV reducida tanto en la población general como en aquellos con enfermedades crónicas, por lo que no es sorprendente que en la acromegalia se mantenga esta relación [42]. Ni el hipopituitarismo, como factor específico de la enfermedad, ni los distintos tratamientos pudieron asociarse con la CdV en la acromegalia [134]. En cohortes con pacientes con acromegalia activa solamente, las puntuaciones de los factores generales de depresión, edad y sexo femenino tuvieron un efecto negativo significativo en la CdV. En cohortes de pacientes con acromegalia en remisión, se encontró que las puntuaciones de depresión tenían una asociación negativa con la calidad de vida, al igual que la radioterapia o la duración de la enfermedad. No se encontró una asociación significativa para el hipopituitarismo o la duración de la remisión [134].

En cuanto al tratamiento, diferentes estudios han puesto de manifiesto que al añadir lanreótida autogel a pacientes no tratados previamente, se produce una mejora en la CdV [135-137]. La adición de pegvisomant a pacientes tratados con análogos de la somatostatina también demostró tener efectos positivos significativos, tanto en pacientes bien controlados como en aquellos con subóptimo control [138, 139].

Existe una herramienta, *Acromegaly Disease Activity Tool (ACRODAT®)*, que incluye 5 parámetros para valorar la actividad de la acromegalia: niveles de IGF-1, tamaño del tumor, comorbilidades, síntomas medidos por el score de signos y síntomas (SSS) [140] y calidad de vida medida por AcroQoL. Cada parámetro tiene tres niveles de gravedad:

- Nivel 1: el paciente está correctamente controlado.



- Nivel 2: el paciente muestra una leve actividad de la enfermedad, por lo que es preciso evaluar su estado de forma más exhaustiva.
- Nivel 3: el paciente muestra una actividad importante de la enfermedad que necesita intervención clínica.

ACRODAT® da una puntuación global comprendida entre 0 y 1 (donde 0 indica una clasificación estricta de estado “estable” y 1 indica una clasificación estricta de “actividad importante de la enfermedad”). El valor de ACRODAT® reside en su capacidad potencial para proporcionar una visión integral de la actividad de la enfermedad en cualquier estadio, independientemente de las intervenciones terapéuticas recibidas. Además de ayudar en la toma de decisiones clínicas, esta herramienta puede contribuir a que se pueda optimizar el manejo de la acromegalia desde un enfoque centrado en el paciente [131].

Se han propuesto una variedad de biomarcadores para predecir la respuesta al tratamiento médico en la acromegalia. Varios grupos han catalogado los predictores potenciales de remisión, incluidas las características del paciente y del tumor y los marcadores de tumores celulares, como los SSTs y otras proteínas de superficie, las moléculas de señalización y los marcadores de diferenciación celular [141]. En el estudio REA los factores asociados al pronóstico de curación quirúrgica fueron el tamaño del adenoma (macro- o micro-adenoma) y el sexo masculino [86]. En la revisión de Ezzat *et al.* [141] la expresión de SST<sub>2</sub>, como se esperaba, es esencial para la capacidad de respuesta de SSA, específicamente para los efectos clínicos de los SSA de primera generación; la clasificación morfológica del tumor parece ser útil tanto para la predicción positiva como negativa de la respuesta de la SSA, y la tasa de éxito del tratamiento se mantiene muy por encima del 50% para los tumores densamente granulados. Por último, en esta revisión, la hipointensidad de T2 se correlacionaba significativamente con el fenotipo de tumor densamente granulado, y existía una relación inversa entre la intensidad de la señal en T2 y la respuesta a SSA clínica y bioquímica, así los tumores hipointensos muestran una tasa de respuesta similar o mejor en relación con los tumores isointensos, y ambos son superiores a los tumores hiperintensos.

Sin embargo, aunque la expresión elevada de SST2, niveles bajos de GH e IGF-1, adenomas densamente granulados o la hipointensidad en T2 preoperatoria se han relacionado con mejor respuesta a SSA [142], no hay consenso disponible sobre la elección de marcadores predictivos. Por ello, hasta el momento, ningún parámetro clínico, bioquímico, inmunohistoquímico o molecular nos permite predecir con seguridad qué pacientes responderán al tratamiento, ni cuál será la evolución de la enfermedad.

### 3. OBJETIVOS



### 3 OBJETIVOS

Por lo tanto, el **objetivo general** de esta tesis es determinar la posible relación entre las características clínico-patológicas o radiológicas de los pacientes al diagnóstico de la acromegalia y la expresión génica de distintos receptores a nivel tumoral, para así poder anticipar cuál podría ser el tratamiento más eficiente en la terapia pre-quirúrgica del paciente. Así mismo, el presente estudio pretendió aportar información sobre si esta expresión de receptores a nivel tumoral puede predecir la curación o recidiva de la acromegalia.

Así, se establecieron 3 objetivos específicos:

- Determinar la relación entre las características clínico-patológicas de los pacientes al diagnóstico de la acromegalia y la expresión de distintos receptores moleculares a nivel tumoral.
- Analizar si existe una relación entre la señal en T2 del adenoma y las características clínico-patológicas de los pacientes al diagnóstico de la acromegalia y/o con la expresión génica de distintos receptores a nivel tumoral.
- Evaluar si esta expresión de receptores moleculares permite predecir la curación o recidiva de la acromegalia



## 4. PACIENTES Y MÉTODOS





## **4 PACIENTES Y MÉTODOS**

Se trata de un estudio observacional retrospectivo unicéntrico. El presente estudio fue llevado a cabo conforme a la Declaración de Helsinki. Se obtuvo un consentimiento informado de cada paciente para la utilización de cada una de las muestras obtenidas mediante cirugía e incluidas en el estudio.

### **4.1 Pacientes**

Se incluyeron todos los pacientes diagnosticados de acromegalia en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba que fueron intervenidos quirúrgicamente desde entre noviembre de 2007 y marzo de 2014 y cuya muestra de tejido tumoral fue analizada molecularmente en el laboratorio del grupo de “Hormonas y Cáncer” del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica (IMIBIC).

Se revisaron las historias clínicas de estos pacientes recogiendo las características clínicas al diagnóstico de la enfermedad, los niveles de GH, IGF-1, GH tras una SOG y otros estudios hormonales, así como las características del adenoma en las técnicas de imagen realizadas al diagnóstico. También se registró la evolución de los pacientes tras el tratamiento quirúrgico: persistencia, recurrencia y remisión de la acromegalia.

Sólo se incluyeron pacientes con un diagnóstico confirmado de acromegalia. Éste se basó en la demostración bioquímica de una GH  $\geq 1$  ng/dl tras una sobrecarga oral de glucosa (SOG) con 75 mg y un nivel de IGF-1 elevado al rango de referencia para su edad y sexo; junto a la presencia de un adenoma hipofisario objetivado en la RMN. En todos los casos, la anatomía patológica de la pieza quirúrgica confirmó la presencia de un somatotropinoma.

Los criterios de curación de la acromegalia son la desaparición del adenoma hipofisario con normalización de GH e IGF-1 y supresión de GH tras SOG por debajo de 1 o 0,4 ng/L), sin necesidad de tratamiento médico. Definimos acromegalia controlada con tratamiento médico como aquellos pacientes con tratamiento que tienen niveles de GH e IGF-1 dentro de la normalidad.

## 4.2 RMN

Los estudios de imagen se realizaron con técnicas de alta resolución de 1,5 T (Magnetom aera 1.5 tesla, Siemens). Para poder incluir a los pacientes, debían tener al menos una secuencia coronal en T1 y T2 y una secuencia sagital. Las imágenes de RMN fueron analizadas por un radiólogo experto en interpretación de imágenes de hipófisis en RMN.

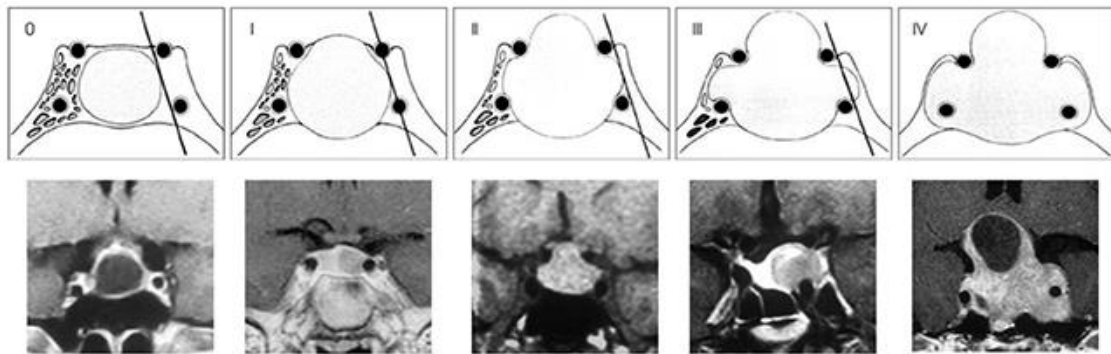
Se recogieron las siguientes características: diámetro anteroposterior (DAP), diámetro transversal (DT), diámetro ínferoposterior (DIP), crecimiento extraselar, supraselar, contacto o no con el quiasma óptico, invasión de senos cavernosos y señal en T1 y T2.

La señal en T2 del adenoma se clasificó como hipo, iso o hiper-intenso comparándolo con el tejido normal hipofisario. Cuando el tejido hipofisario normal no se ve, como es habitualmente el caso de los macroadenomas hipofisarios, la señal del adenoma se comparó con la sustancia gris del lóbulo temporal.

La invasión de los senos cavernosos se clasificó de acuerdo con la clasificación de Knosp *et al.* [92] (Figura 8). Estos autores proponen la clasificación de los tumores que invaden el seno cavernoso en cinco grados (0, 1, 2, 3 y 4).

- Grado 0: El tumor no invade el seno cavernoso. Todas las estructuras anatómicas intracavernosas están preservadas. El tumor no sobrepasa la línea tangencial que une la pared medial de la arteria carótida interna supracavernosa con la carótida interna intracavernosa.
- Grado 1: El tumor sobrepasa la tangente medial (definida como la tangente que une los dos bordes mediales de la carótida supra e intracavernosa) pero no sobrepasa la línea tangencial que une los dos centros de la carótida supra e intracavernosas; los compartimentos venosos superior e inferior pueden estar obstruidos según el crecimiento de la lesión sea en sentido superior o inferior respectivamente.
- Grado 2: Se caracteriza porque el tumor se extiende por fuera de la línea intercarotídea, sin sobrepasar la tangente lateral de la carótida intrasupracavernosa.

- Grado 3: el tumor se extiende lateralmente a la línea tangencial lateral que une la porción carotídea supracavernosa con la intracavernosa. Los compartimentos venosos medial, superior e inferior suelen estar parcial o completamente obstruidos.
- Grado 4: Se caracteriza porque la carótida está totalmente englobada por el tumor, estando todos los compartimentos venosos obliterados.



**Figura 8.** Índice de Knosp. Imágenes de RMN representativas de los distintos grados (fila inferior) y representación esquemática de las mismas, indicando los criterios de cumplimiento de cada uno de ellos (fila superior). Grado 0: El tumor no invade el seno cavernoso. Grado 1: El tumor sobrepasa la tangente medial, pero no sobrepasa la línea tangencial que une los dos centros de la carótida supra e intracavernosas. Grado 2: el tumor se extiende por fuera de la línea intercarotídea, sin sobrepasar la tangente lateral de la carótida intrasupracavernosa. Grado 3: el tumor se extiende lateralmente a la línea tangencial lateral que une la porción carotídea supracavernosa con la intracavernosa. Grado 4: la carótida está totalmente englobada por el tumor, estando todos los compartimentos venosos obliterados [92].

### 4.3 Análisis hormonal

Los niveles de IGF-1 se determinaron por ensayo inmunoradiométrico (#A15729 Immunotech SAS, Marseille, France) y se compararon con el límite superior del rango normal ajustado por edad y sexo. La GH se determine por quimioluminiscencia en un ensayo inmunoradiométrico (#HGH-RIACT, Cisbio Bioassays, Codolet, France). Toda la información sobre especificidad, detectabilidad y reproducibilidad para cada ensayo se puede ver en la web de la compañía.

- **Muestra de adenoma somatotropo.**

Un total de 22 muestras de adenoma hipofisario productor de GH se extrajeron mediante resección transesfenoidal y se analizaron en el laboratorio del grupo

“Hormonas y Cáncer” del IMIBIC. Tras la cirugía, se transfirieron porciones de adenomas somatotropos a medio de cultivo S-MEM (Gibco, Madrid, España) estéril y frío (4-8°C), y se trasladaron inmediatamente al laboratorio.

- **Dispersión y cultivo celular.**

En la sala de cultivos celulares y bajo condiciones de esterilidad, cada muestra se troceó en fragmentos de 1-2 mm<sup>3</sup> utilizando bisturís de un solo uso siguiendo un protocolo descrito previamente [143, 144] . Posteriormente, una pequeña porción de estos fragmentos se colocó en un criotubo, que se congeló a -80°C para la subsiguiente extracción de ARN, retro-transcripción y análisis del perfil de expresión génica.

- **Extracción de ARN total y retrotranscripción en las muestras de adenomas hipofisarios.**

Los fragmentos de tejido hipofisario congelados se procesados para la extracción de ARN total utilizando el kit Absolutely RNA Miniprep (Stratagene, Madrid, España), siguiendo el procedimiento previamente descrito [143]. El ARN total se cuantificó mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EEUU) y se retrotranscribió a ADN-copia (ADNc) utilizando el kit Revert Aid First Strand cDNA synthesis (MRE Fermentas, Hanover, MD, EEUU) siguiendo el manual del fabricante.

- **PCR cuantitativa a tiempo real (qrtPCR).**

Para el ensayo de *qrtPCR* se empleó la solución Brilliant III SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent, Madrid, España) utilizando el termociclador Mx3000P (Stratagene, Madrid, España). Esta técnica nos permitió conocer los valores absolutos de ARNm de los genes de interés en las muestras analizadas. El volumen final para la reacción fue de 20 µL: 1µL de ADNc, 10µL Brilliant III SYBR Green QPCR Master Mix, 0,3µL de cada cebador (a partir de una solución de 10µM) y 8,4µL de H<sub>2</sub>O destilada. El perfil térmico consistió en un paso de desnaturalización previa a 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización (95°C, 20 segundos) y unión de cebadores (60°C, 20 segundos). Además, para asegurarnos de que el producto amplificado en la *qrtPCR* era solo el transcrito específico, al finalizar todas las reacciones de PCR se obtuvo la curva de

disociación de dichos productos. Por último, para controlar las variaciones en la cantidad de muestra de ARN total, se determinó la expresión de  $\beta$ -actina en cada una de las muestras incluidas en el presente estudio, cuyos niveles se emplearon para normalizar los datos absolutos de número de copias de cada uno de los genes analizados en el estudio. Concretamente, los genes analizados en el presente estudio fueron: todas las hormonas hipofisarias (GH, PRL, POMC, FSH, LH y TSH), receptores de somatostatina (SST<sub>1</sub>, SST<sub>2</sub>, SST<sub>3</sub>, SST<sub>5</sub>), receptores de dopamina (DR1, DR2T, DR2L, DRD4, DR5), otros receptores hormonales [receptor de GHRH (GHRH-R), receptor de ghrelina (GHR51a) y receptor de vasopresina subtipo-1b (AVPR1b)] y marcadores de proliferación (ki67, y PTTG).

#### **4.4 Análisis estadístico.**

Para el análisis descriptivo de variables cualitativas se emplearon las frecuencias absolutas y el porcentaje para cada categoría. Las variables cuantitativas se expresaron con su media  $\pm$  desviación estándar ( $m \pm DE$ ) y se comprobó la normalidad de estas mediante el test de Shapiro-Wilk. Cuando las variables no fueron normales se utilizaron test no paramétricos en función de las características de las mismas. Para la asociación de variables cualitativas se empleó el test de la chi cuadrado. Para la comparación de medias se emplearon los test de Student o la U de Mann Whitney en función de si eran variables paramétricas o no. Se utilizó la correlación de Spearman como medida de asociación de variables no paramétricas. En todo momento se trabajó con significación estadística del 5% y se empleó el programa estadístico SPSS para Windows versión 18.0 (Córdoba, España).



## 5. RESULTADOS

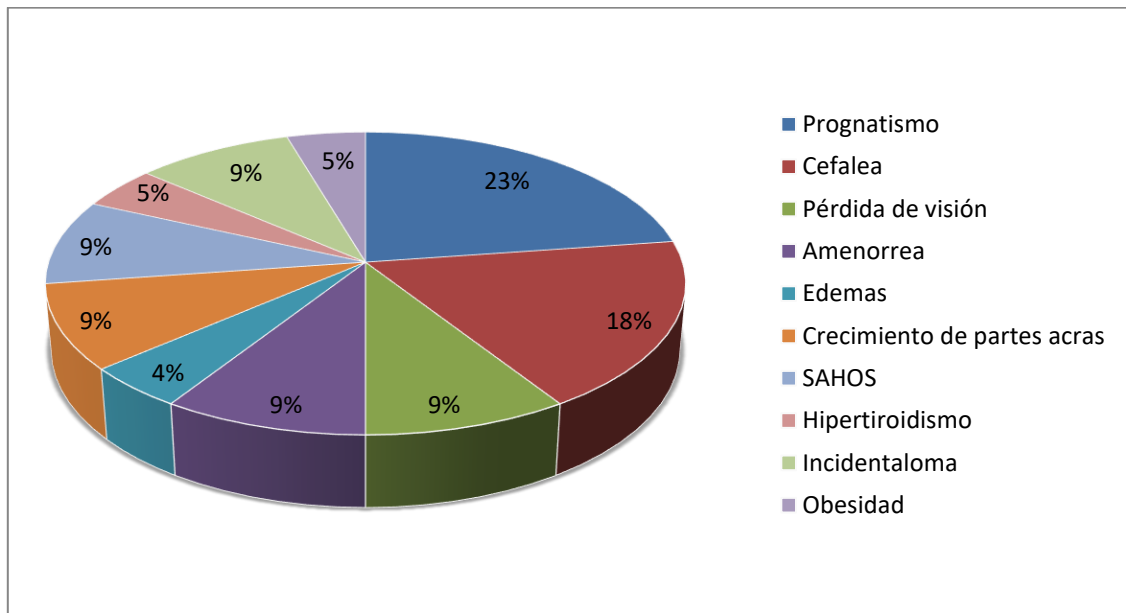




## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características basales de la población de estudio.

En el presente estudio se incluyeron 22 pacientes diagnosticados de acromegalia, intervenidos quirúrgicamente entre noviembre de 2007 y marzo de 2014; dos de ellos se re-intervinieron en este tiempo, por lo que contamos con 24 muestras de hipófisis. Concretamente, el 59,1 % fueron mujeres (n=13) con una edad media de  $33,80 \pm 7,43$  años (Rango 13 - 73 años), y un índice de masa corporal (IMC) medio de  $29,69 \pm 3,15$   $\text{kg}/\text{m}^2$  (Rango: 26,53 – 36,33). El 40,9 % fueron hombres (n = 9) con una edad media de  $33,80 \pm 7,43$  años (Rango 26 - 43 años), y un índice de masa corporal (IMC) medio de  $27,56 \pm 5,83$   $\text{kg}/\text{m}^2$  (Rango: 18,17 - 32,50). El 22,7% de los pacientes eran fumadores. El motivo de consulta más frecuente fue el prognatismo (22,7 %), seguido por la cefalea (18,2 %) y por el crecimiento de partes acras, pérdida de visión, amenorrea y síndrome de apnea/hipopnea obstructiva del sueño (SAHOS) (9,1 %) (Figura 9).



**Figura 9.** Distribución del motivo de consulta de los 22 pacientes incluidos en el presente estudio (SAHOS: síndrome de apnea/hipopnea obstructiva del sueño)

Las manifestaciones clínicas más frecuentes al diagnóstico se muestran en la tabla 5. Destacan el crecimiento de partes acras (63,6 %), cefalea (40,9 %), prognatismo (36,4 %), hiperhidrosis (36,4 %) y artralgias (36,4%). Entre las comorbilidades asociadas a la acromegalia, destaca la hipertensión arterial (HTA) en el 27,3%, la diabetes mellitus (DM) en el 22,7%, y la osteoporosis en el 13,6 %. El 23,5% de los pacientes presentan alteraciones visuales, de los cuales el 13,6 % presentan una cuadrantanopsia y el 4,5 % una hemianopsia. Ninguno de los pacientes tenía enfermedad cerebrovascular o cardiovascular al diagnóstico. Tampoco apareció en ningún paciente el síndrome del túnel del carpo. Entre las mujeres, el 33,3 % presentaban alteraciones menstruales. No existen diferencias por sexos en cuanto a los síntomas presentados al diagnóstico, salvo en la presencia de cefalea, que es más prevalente en mujeres que en hombres (61,5 % en mujeres vs 11,1 % en hombres,  $p = 0,018$ ).

**Tabla 5.** Síntomas y signos al diagnóstico de la acromegalia. Comorbilidades asociadas. (SAHOS: síndrome de apnea/hipopnea obstructiva del sueño).

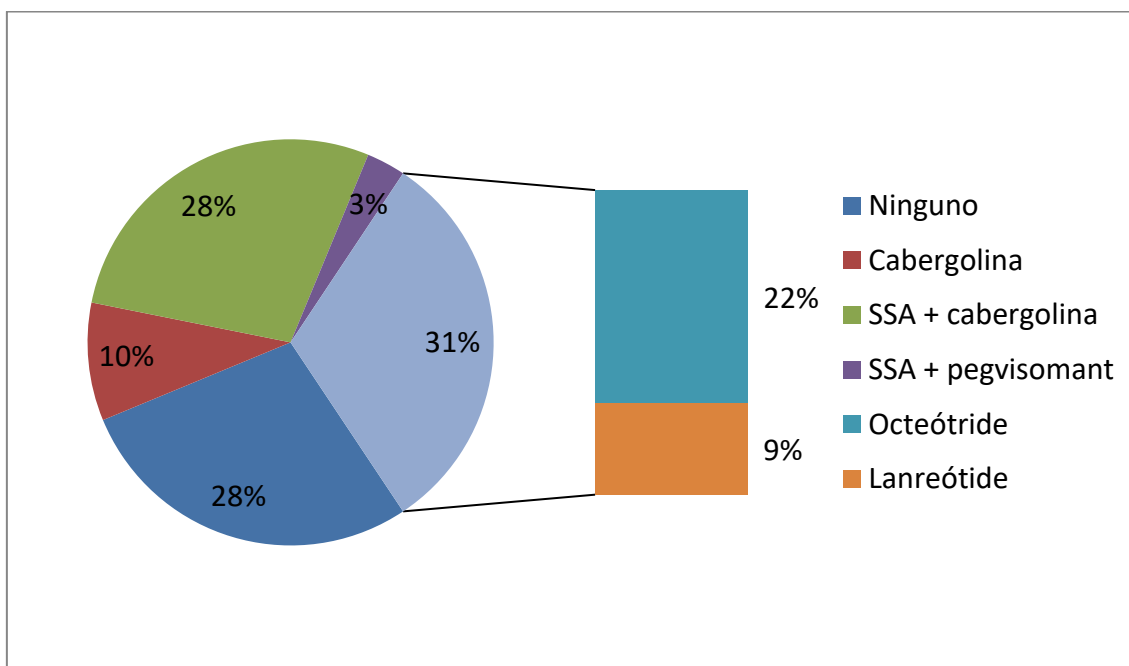
	Total	Mujeres	Hombres	p
	Porcentaje (frecuencia absoluta)	Porcentaje (frecuencia absoluta)	Porcentaje (frecuencia absoluta)	
<b>MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b>				
<b>Crecimiento de partes acras</b>	63,6% (14)	61,5% (8)	66,7% (6)	0,806
<b>Hiperhidrosis</b>	36,4% (8)	46,2% (6)	22,2% (2)	0,251
<b>Cefalea</b>	40,9% (9)	61,5% (8)	11,1% (1)	0,018
<b>Artrosis</b>	22,7% (5)	30,8% (4)	11,1% (1)	0,279
<b>Artralgias</b>	36,4% (8)	46,2% (6)	22,2% (2)	0,251
<b>Prognatismo</b>	36,4% (8)	23,1% (3)	55,6% (5)	0,119
<b>Disminución de la libido</b>	4,5% (1)	0 (0)	11,1% (1)	0,219
<b>Alteraciones menstruales (solo mujeres)</b>	33,3% (4)	33,3% (4)		
<b>Alteraciones visuales:</b>	18,2% (4)	23,1% (3)	11,1% (1)	0,474
- <b>Cuadrantanopsia</b>	13,6% (3)	15,4% (2)	11,1% (1)	
- <b>Hemianopsia</b>	4,5% (1)	7,7% (1)	0 (0)	0,652
<b>COMORBILIDADES ASOCIADAS</b>				
<b>Diabetes Mellitus</b>	22,7% (5)	30,8% (4)	11,1% (1)	0,279
<b>SAHOS</b>	13,6% (3)	7,7% (1)	22,2% (2)	0,329
<b>Hipertensión arterial</b>	27,3% (6)	30,8% (4)	22,2% (2)	0,658
<b>Osteoporosis</b>	13,6% (3)	15,4% (2)	11,1% (1)	0,731

Las características basales de la analítica se muestran en la tabla 6, donde destaca una GH media al inicio de  $8,24 \pm 8,25$  ng/ml, una IGF-1 de  $607,00 \pm 268,68$  ng/ml y un nadir de GH tras sobrecarga oral de glucosa de  $7,45 \pm 8,69$  ng/ml. No existen diferencias por sexos, salvo que en hombres el nadir fue significativamente mayor que en mujeres ( $11,07 \pm 11,11$  vs  $3,83 \pm 2,89$  respectivamente;  $p < 0,001$ ), y los niveles de GH basales también fueron mayores ( $11,19 \pm 10,25$  vs  $5,83 \pm 5,58$  respectivamente,  $p = 0,010$ ).

**Tabla 6.** Características analíticas basales. En la segunda columna se muestran los datos de toda la muestra. En la columna 4 y 5 aparecen datos de mujeres y hombres y en la 6 la significación estadística (p). (LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; TSH: tirotropina; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; GH: hormona de crecimiento; IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1, SOG: sobrecarga oral de glucosa).

	Total (Media $\pm$ Desviación)	Rango	Mujeres (Media $\pm$ Desviación)	Hombres (Media $\pm$ Desviación)	Significación estadística P
Glucosa (mg/dl)	114,29 $\pm$ 45,55	81 – 294	110,58 $\pm$ 22,88	119,22 $\pm$ 66,48	0,508
HbA1c (%)	6,34 $\pm$ 0,97	5,10 – 8,90	6,26 $\pm$ 0,59	6,46 $\pm$ 1,44	1
Colesterol total (mg/dl)	212,06 $\pm$ 46,70	143 – 310	220,80 $\pm$ 43,22	201,13 $\pm$ 51,48	0,274
LDL (mg/dl)	137,67 $\pm$ 47,86	46 – 230	142,10 $\pm$ 51,34	132,13 $\pm$ 45,49	0,633
HDL (mg/dl)	48,44 $\pm$ 17,85	31 – 107	53,60 $\pm$ 20,67	42,00 $\pm$ 11,79	0,122
Triglicéridos (mg/dl)	125,06 $\pm$ 56,88	37- 248	123,80 $\pm$ 57,55	126,63 $\pm$ 59,97	0,956
Cortisol (mcg/dl)	11,20 $\pm$ 5,67	2,20 – 22,20	12,52 $\pm$ 6,45	9,89 $\pm$ 4,91	0,425
Prolactina (mcg/L)	64,34 $\pm$ 99,82	0,74 – 434,99	77,14 $\pm$ 125,330	45,15 $\pm$ 40,75	0,970
TSH (mU/L)	1,32 $\pm$ 0,70	0,01- 2,92	1,50 $\pm$ 0,69	1,10 $\pm$ 0,68	0,354
T4L (pg/dl)	0,92 $\pm$ 0,33	0,50 -2,21	1,01 $\pm$ 0,43	0,86 $\pm$ 0,12	0,432
GH (ng/dl)	8,24 $\pm$ 8,25	0,30 – 25,00	5,83 $\pm$ 5,58	11,19 $\pm$ 10,25	0,010
IGF-1 (ng/ml)	607,00 $\pm$ 268,68	150,62 - 1163,80	607,81 $\pm$ 280,94	605,84 $\pm$ 266,64	0,690
Nadir GH tras SOG	7,45 $\pm$ 8,69	0,70 - 25	3,83 $\pm$ 289	11,07 $\pm$ 11,10	< 0,001

En la figura 10 se muestra el tratamiento pre-quirúrgico de los pacientes: el 11,6 % no tuvo tratamiento, el 62,5 % se trató con SSA, el 9,4 % con cabergolina y el resto con un tratamiento combinado de SSA y cabergolina (28,1 %) o SSA y pegvisomant (3,1 %). Tres pacientes precisaron tratamiento sustitutivo con levotiroxina, uno con hidrocortisona y levotiroxina; y dos con estrógenos y gestágenos.



**Figura 10.** Tratamiento pre-quirúrgico de los pacientes. El 31% de los pacientes están en tratamiento con análogos de la somatostatina, de los cuales el 22 % con octreótida y el 9 % con lanreótida. (SSA: análogos de somatostatina).

## 5.2 Estudio de imagen.

A todos los pacientes se les realizó una RMN antes de la cirugía. El 94,7% de los pacientes presentaban un macroadenoma. Los diámetros medios anteroposterior (DAP), transversal (DT) e inferoposterior (DIP) fueron  $18,62 \pm 6,78$ ,  $18,97 \pm 8,09$  y  $18,87 \pm 8,28$  mm respectivamente. Como se muestra en la tabla 7, si clasificamos los adenomas en función del tamaño en menores de 10 mm, entre 10 - 20 mm y mayores de 20 mm, objetivamos que los pacientes con adenomas más grandes tienen niveles más altos de IGF-1 y un nadir mayor de GH tras la SOG; aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas.

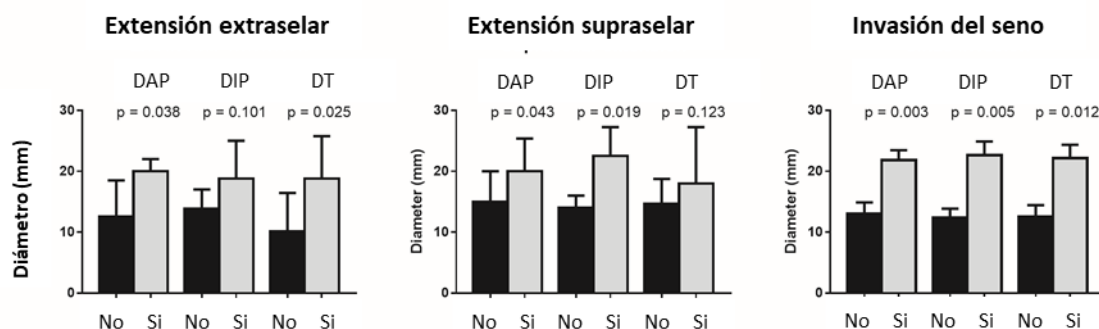
**Tabla 7.** Características de los somatotropinomas de acuerdo con el diámetro máximo del tumor. Los tumores productores de GH se clasificaron en tres grupos según el diámetro máximo (menores de 10 mm, entre 10 - 20 mm y mayores de 20 mm) y según datos demográficos (sexo y edad al diagnóstico) y datos clínicos (niveles de IGF-1 y nadir de GH tras SOG (sobrecarga oral de glucosa). (IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1; GH: hormona de crecimiento)

Tamaño del tumor	≤ 10 mm	10 - 20 mm	> 20 mm	p
Número	1	12	9	-
Sexo (♂ / ♀)	0 vs 1	6 vs 7	3 vs 5	0,551
Edad al diagnóstico	36	41,55 ± 17,74	41,13 ± 19,28	0,961
IGF_1 (nd/dl)	500,43	568,49 ± 276,66	626,34 ± 307,09	0,673
Nadir GH (ng/dl)	5,53	6,37 ± 7,88	12,00 ± 11,36	0,311

#### A- Crecimiento extraselar.

El 78,90 % de los tumores estudiados presentaba crecimiento extraselar, de ellos, el 63,2 % mostró además crecimiento supraselar. Como es esperable, los tumores con crecimiento extra/supraselar son más grandes en todos los diámetros que aquellos que no presentaban crecimiento extra/supraselar [DAP: 20,97 ± 6,58 vs 14,57 ± 5,32mm (p = 0,035); DT: 22,14 ± 8,14 vs 13,26 ± 4,18 mm (p = 0,038); DIP: 20,97 ± 6,58 vs 14,57 ± 5,32 mm (p = 0,007)] (Figura 11). No existen diferencias estadísticamente significativas en niveles hormonales, ni por sexos o edad en estos grupos.

El 26,3 % de los casos presentaban una invasión del seno cavernoso derecho, y el 21,1 % del izquierdo y el 15,8 % presentaban invasión de ambos senos. En la tabla 8, se objetiva que los tumores con mayor índice de Knosp son más grandes, sin diferencias en el resto de los parámetros estudiados, incluyendo los niveles de IGF-1.



**Figura 11.** Asociación entre la extensión extraselar/supraselar y la invasión y el diámetro de los somatotropinomas. El diámetro del tumor productor de GH se midió en milímetros. (DAP: diámetro anteroposterior; DT: diámetro transversal; DIP: diámetro íferoposterior. Los datos representan mediana  $\pm$  rango intercuartílico en la extensión extra/supraselar y media  $\pm$  desviación estándar en la invasión de los senos).

**Tabla 8.** Características de los adenomas hipofisarios en función del Índice de Knosp. (GH: Hormona de crecimiento; IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1; DAP: diámetro anteroposterior; DT: diámetro transversal; DIP: diámetro íferoposterior).

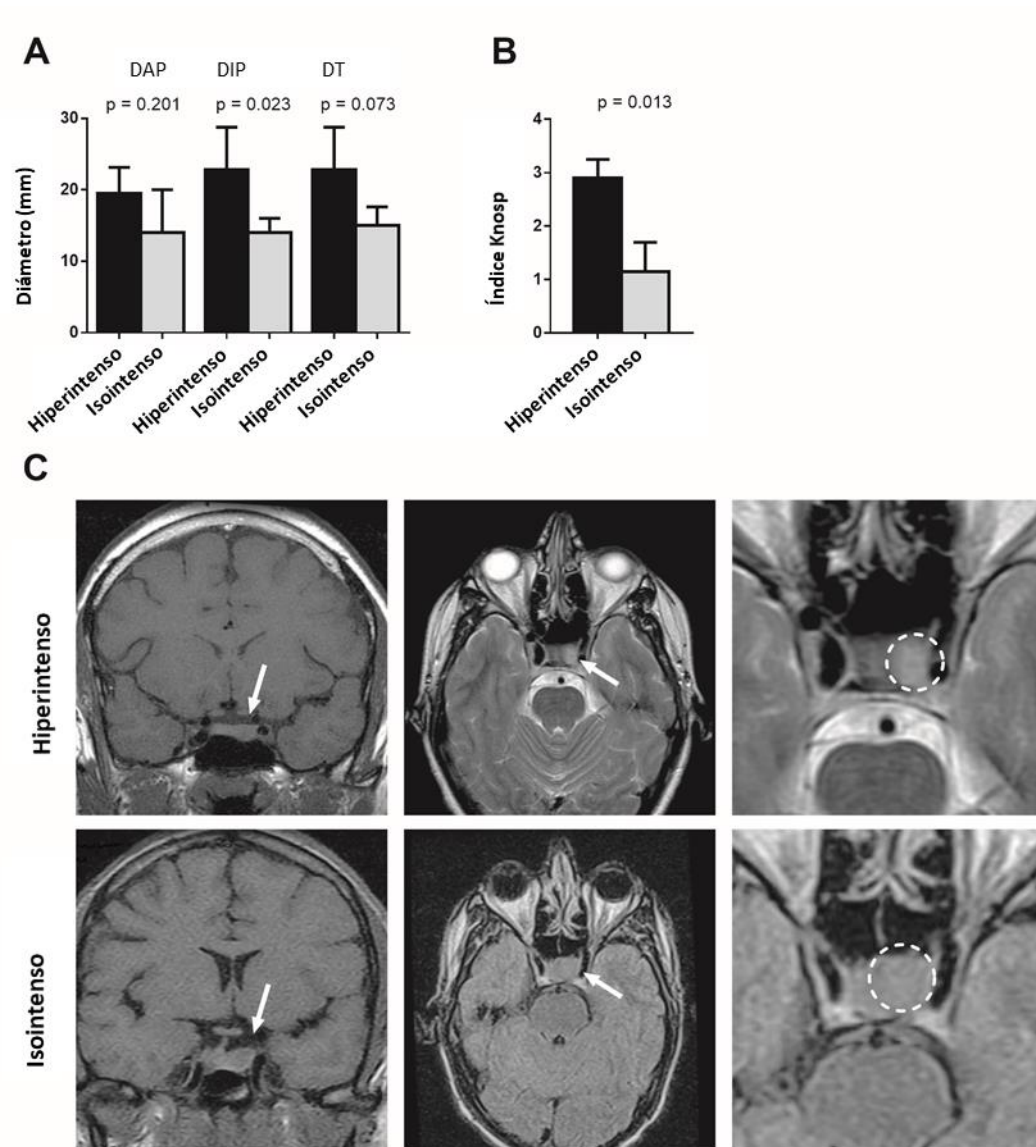
Índice de Knosp	0	1	2	3	4	P
%	17,6%	17,6%	23,5%	11,8%	29,4%	-
Edad (años)	35,67 $\pm$ 7,51	29,33 $\pm$ 14,50	29,50 $\pm$ 13,03	62,00 $\pm$ 15,56	47,40 $\pm$ 18,68	0,116
IGF-1 (ng/ml)	547,80 $\pm$ 116,25	423,18 $\pm$ 264,93	516,47 $\pm$ 300,18	493,05 $\pm$ 311,95	597,91 $\pm$ 401,64	0,956
Nadir GH (ng/ml)	11,41 $\pm$ 11,80	10,95 $\pm$ 9,32	9,79 $\pm$ 10,46	8,84 $\pm$ 7,98	8,75 $\pm$ 10,08	0,861
Sexo ( $\sigma$ / $\rho$ )	3 / 1	1 / 3	3 / 3	0 / 2	2 / 4	0,067
DAP (mm)	10,00 $\pm$ 4,58	15,20 $\pm$ 4,70	18,70 $\pm$ 3,50	16,90 $\pm$ 1,56	26,50 $\pm$ 5,54	<b>0,004</b>
DT (mm)	8,77 $\pm$ 2,85	17,87 $\pm$ 3,01	18,15 $\pm$ 4,57	17,65 $\pm$ 3,32	27,12 $\pm$ 9,36	<b>0,022</b>
DIP (mm)	11,10 $\pm$ 4,76	15,17 $\pm$ 4,76	16,97 $\pm$ 5,98	17,90 $\pm$ 4,38	29,60 $\pm$ 6,42	<b>0,003</b>

## B- Señal en T2.

En las secuencias en T2, el 58,8 % de los adenomas eran hiperintensos y el 41,2 % isointensos; no describiéndose ninguno hipointenso. No existen diferencias significativas en la señal en T2 en función del sexo, la edad ( $44,90 \pm 19,50$  vs.  $32,14 \pm 10,54$  años;  $p = 0,138$  hiperintensos vs isointensos), los niveles de IGF-1 ( $591,15 \pm 296,13$  vs.  $533,90 \pm 216,60$  ng/ml;  $p = 0,670$ ) o el nadir de GH al diagnóstico ( $7,40 \pm 9,18$  vs  $10,81 \pm 10,40$  ng/dl;  $p = 0,560$ ).

Los adenomas hiperintensos en T2 tienen un DAP, DT y un DIP numéricamente mayor que los isointensos (Figura 12A), siendo estadísticamente significativa esta diferencia en el DIP. El índice de Knosp medio de los adenomas hiperintensos es de  $2,90 \pm 1,10$  frente a  $1,14 \pm 1,46$  de los adenomas isointensos ( $p = 0,013$ ) (Figura 12B). En la figura 12C se muestran imágenes representativas de adenomas hiperintensos e isointensos en T2.

Todos los adenomas hiperintensos en T2 presentan crecimiento extraselar, frente a sólo el 42,9 % de los isointensos ( $p = 0,023$ ). Además, los adenomas hiperintensos en T2 tienen más crecimiento supraselar (90 %) que los isointensos (42,9 %) ( $p = 0,036$ ). La invasión de senos cavernosos es también más frecuente en los adenomas hiperintensos en T2 (90 %) que en los isointensos (42,9 %) ( $p = 0,036$ ).



**Figura 12.** Asociación entre la señal en T2 y el diámetro (A) y el índice de Knosp (B) en somatotropinomas. El diámetro del adenoma productor de GH se mide en milímetros. (DAP: diámetro anteroposterior; DT: diámetro transversal; DIP: diámetro ínferoposterior. Los datos representan mediana  $\pm$  rango intercuartílico). C) Clasificación de tumores productores de GH en función de su intensidad en T2: Adenomas hiperintensos en las imágenes superiores e isointensos en las imágenes inferiores. La región del tumor se marca con una flecha en los cortes coronales (izquierda) y en el corte axial (centro), en la derecha se marca con un círculo.



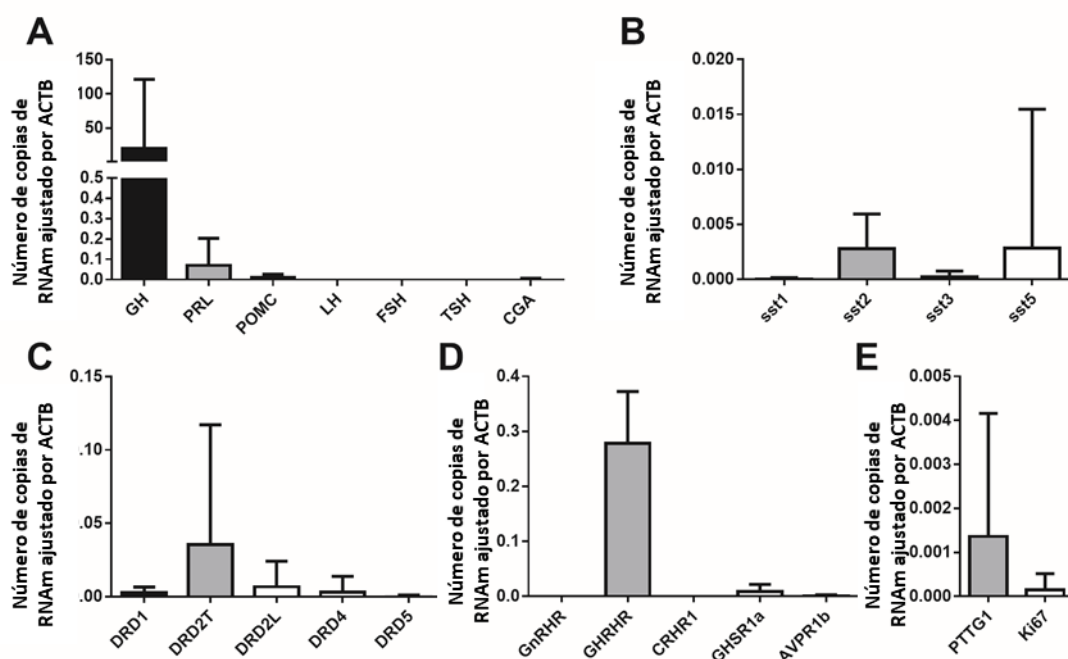
### 5.3 Estudio molecular del tumor.

En la figura 13A se muestra los niveles de expresión (número de copias de ARNm) de las distintas hormonas hipofisarias en las muestras tumorales ajustados por beta-actina (ACTB): GH, prolactina (PRL), POMC (precursor de ACTH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y tirotrópina (TSH). Lógicamente, el estudio molecular corroboró que los somatotropinomas expresan alta cantidad de GH ( $19,59 \pm 11,74$  copias/ajustadas por ACTB). Además, comprobamos que en muchos casos existía una pequeña expresión de otros tipos hormonales como son principalmente la PRL ( $0,07 \pm 0,147$  copias/ajustadas por ACTB) y POMC ( $0,01 \pm 0,017$  copias/ajustadas por ACTB), algo que no es extraño conociendo el origen común (ancestro celular común) de estos tipos celulares.

En la figura 13B y 13C se muestra la expresión de receptores neurohormonales (SSTs y DRs). Este análisis demostró los receptores de somatostatina más expresados son SST<sub>5</sub> y SST<sub>2</sub> (presentes en un 95 % de los tumores en ambos casos), seguidos de SST<sub>3</sub> (74 %) y SST<sub>1</sub> (59%). Por su parte, el receptor de dopamina predominante fue DR2 (100% de los casos) seguido de DR4 (89 %), DR1 (87 %) y DR5 (80 %). Como era esperable GHRHR y GHSR1a también se expresan en altos niveles en los somatotropinomas (100 % y 92 % de los casos, respectivamente; Figura 12 D), siendo los niveles de mRNA de GHRHR significativamente mayores que los de GHSR1a. En cambio, otros subtipos de receptores involucrados en la función de diferentes tipos celulares hipofisarios como GnRHR, CRHR1 o AVPR1b no se expresan de forma apreciable en los adenomas productores de GH (Figura 13D). Asimismo, de los dos marcadores de proliferación evaluados en nuestra cohorte, encontramos que los niveles de PTTG eran mayores que los de Ki67 (Figura 13E).

Los adenomas con crecimiento extraselar presentan mayor expresión de SST<sub>3</sub> ( $0,005 \pm 0,011$ ) que aquellos sin crecimiento extraselar ( $0,00006 \pm 0,00008$ ;  $p = 0,049$ ) (Figura 14A) y mayor expresión de Ki67 ( $0,023 \pm 0,057$  vs  $0,000 \pm 0,00$ ;  $p = 0,030$ ). Además, concretamente aquellos con crecimiento supraselar tienen mayor expresión de SST<sub>3</sub> ( $0,006 \pm 0,013$  vs  $0,0002 \pm 0,0004$ ;  $p = 0,013$ ), DR4 ( $0,009 \pm 0,007$  vs  $0,001 \pm 0,001$ ;  $p = 0,028$ ) y DR5 ( $0,026 \pm 0,058$  vs  $0,0001 \pm 0,0001$ ;  $p = 0,003$ ) que aquellos sin crecimiento

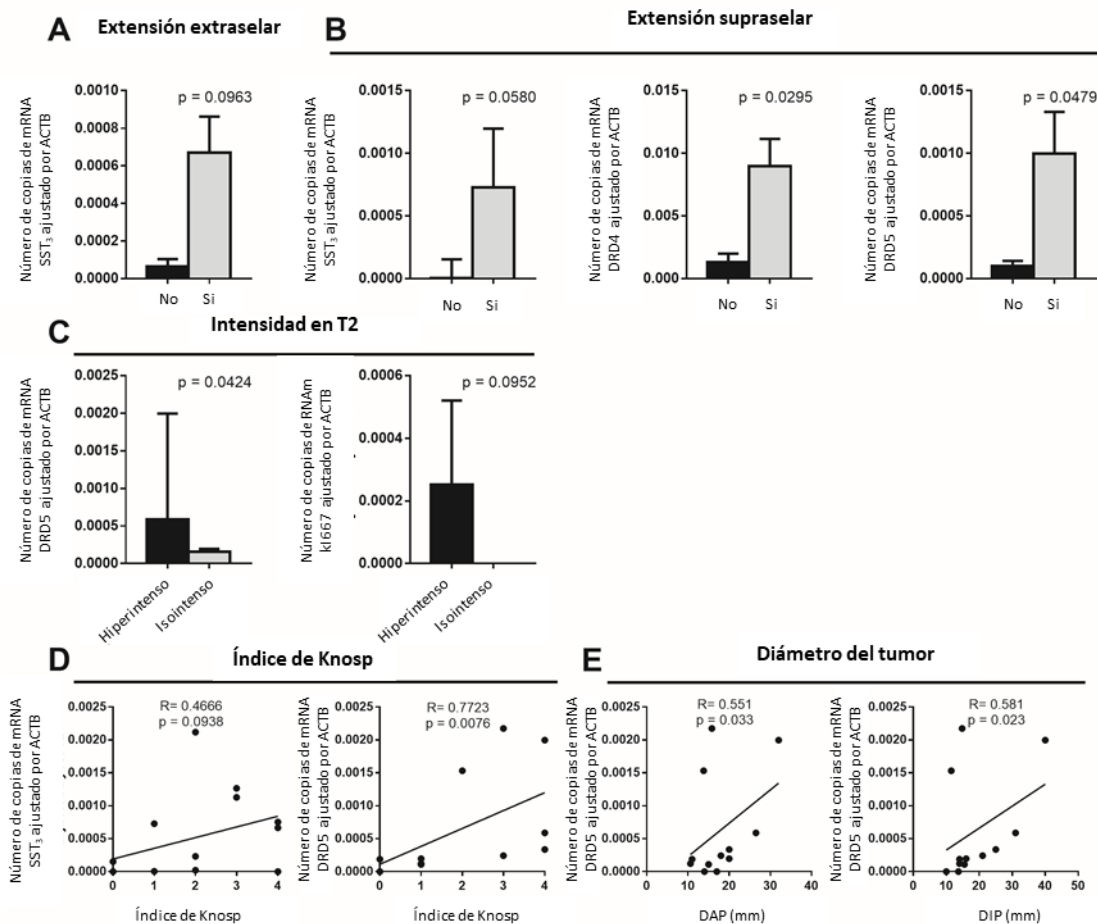
supraselar (Figura 14B). No se encontraron diferencias en cuanto a la invasión de senos cavernosos.



**Figura 13.** Características moleculares de los somatotropinomas estudiados (n=22). Se muestran niveles de expresión (ARNm) de: **A:** Hormonas hipofisarias: hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL), propiomelanocortina (POMC, precursor de la ACTH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y tirotropina (TSH), y la alfa subunidad de las glicoproteínas (CGA); **B:** Cuatro de los cinco subtipos de receptores de somatostatina (SST<sub>1</sub>, SST<sub>2</sub>, SST<sub>3</sub>, y SST<sub>5</sub>); **C:** Cuatro de los cinco receptores de dopamina (DRD1, DRD2, DRD3, DRD5), incluyendo el subtipo 2 total (DRD2T) y su isoforma larga (DRD2L); **D:** otros receptores: receptor de la hormona estimulante de gonadotropinas (GnRH), receptor de hormona liberadora de GH (GHRHR), receptor de hormona liberadora de ACTH (CRHR1), receptor de ghrelina (GHSR1a), receptor de arginina-vasopresina 1b (AVPR1b); **E:** marcadores de proliferación (PTTG1 y Ki67). Los datos se presentan como mediana ± rango intercuartílico del valor absoluto (número de copias) ajustados por la expresión del gen control (*housekeeping*; beta-actina, ACTB).

Los adenomas hiperintensos en T2 presentan una expresión de DR5 ( $0,026 \pm 0,058$  vs.  $0,0001 \pm 0,00009$ ;  $p = 0,014$ ) y de Ki67 ( $0,025 \pm 0,060$  vs.  $0,000 \pm 0,0000$ ;  $p = 0,036$ ) significativamente superior que aquellos isointensos (Figura 14C). En cambio, no se observaron diferencias en la expresión hormonal o de otros receptores en estos adenomas.

Cabe notar que existe una correlación directa entre el índice de Knosp y la expresión de SST<sub>3</sub> (Rho 0.517, p = 0.048) y la de DR5 (Rho 0.594, p = 0.020) (Figura 14D). También se observó que la expresión de DR5 se correlaciona de forma directa tanto con el DAP (Rho 0.551, p = 0.033) como con el DIP (Rho 0.581, p = 0.023) (Figura 14E).



**Figura 14.** Asociación entre los marcadores moleculares y el fenotipo tumoral. **A y B:** asociación entre la presencia de extensión extraselar y supraselar y los niveles de mRNA de SSTs, DR4 y DR5. **C:** Asociación entre la señal en T2 y los niveles de mRNA de DR5 y Ki67. **D y E:** Correlación entre el índice de Knosp y el diámetro tumoral y los niveles de mRNA de SST<sub>3</sub> y DR5.

#### 5.4 Resultados post cirugía.

Sólo tres de los 22 pacientes en los que se realizó la cirugía por vía transesfenoidal tuvieron complicaciones. En un paciente apareció una diabetes insípida transitoria, en

otro una fístula de líquido cefalorraquídeo transitoria y en el último apareció una lesión del nervio óptico.

En la tabla 9 se muestran los resultados medios de la analítica de los pacientes tras la cirugía.

**Tabla 9.** Resultados de la analítica post-cirugía. (DS: desviación estándar, TSH: tiotropina; GH: hormona de crecimiento; IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1).

	Media ± DS	Rango
<b>Cortisol basal post cirugía (mcg/dl)</b>	13,59 ± 6,19	7,00 - 28,90
<b>Prolactina post cirugía (mcg/L)</b>	8,26 ± 6,92	0,60 - 20,88
<b>TSH Post cirugía (mU/L)</b>	1,32 ± 0,91	0,00 - 3,13
<b>GH Post cirugía (ng/ml)</b>	1,89 ± 1,31	0,41 - 5,73
<b>IGF-1 Post cirugía (ng/ml)</b>	492,09 ± 252,97	144,77 – 919,16

Tras la cirugía, el 22,2 % (4) de los pacientes presentaban criterios de curación. En 2 pacientes no se consiguió el control bioquímico tras la cirugía, a pesar de intensificar el tratamiento médico, y dado que en la RMN quedaba un resto tumoral grande, se decidió reintervenir. Siete pacientes (31,8 %) precisaron tratamiento con radioterapia estereotáxica fraccionada (REF) por la falta de control bioquímico y clínico de la enfermedad y objetivarse un resto de tumoral intraselar no subsidiario de tratamiento quirúrgico.

En diciembre de 2020, el 27,8 % están curados quirúrgicamente, el 66,7 % están controlados bioquímicamente y el 94,4 % controlados clínicamente. No existen diferencias estadísticamente significativas en los pacientes curados quirúrgicamente o controlados bioquímicamente entre aquellos que recibieron tratamiento con SSA antes de la cirugía, con respecto a los que no lo recibieron.

No existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a curación de la acromegalia, o control de la misma, entre adenomas hiperintensos en T2 o isointensos. Dentro de los adenomas hiperintensos en T2 se curan el 14,3 % de los pacientes, y se controlan el 57,1 %; mientras que en los adenomas isointensos son el 14,3 % (p = 0,769)

y el 74,1 % ( $p = 0,500$ ) respectivamente. De los pacientes con crecimiento extraselar ninguno cumple criterios de curación, frente al 71,4 % de los que no tiene crecimiento extraselar que sí los cumple ( $p = 0,050$ ).

### 5.5 Correlación entre los datos clínicos y el estudio molecular.

Los pacientes con alteraciones visuales expresan menos DR4 que los que no presentan alteraciones visuales [ $0,0013 \pm 0,0026$  vs.  $0,0085 \pm 0,0082$  copias mRNA ( $p = 0,049$ )] y menos DR1 [ $0,0015 \pm 0,0285$  vs.  $0,0286 \pm 0,0540$  copias mRNA ( $p = 0,034$ )]. Los pacientes con hiperhidrosis expresan más LH [ $0,190 \pm 0,417$  vs.  $0,000 \pm 0,000$  copias mRNA ( $p = 0,014$ )], más TSH [ $8,023 \pm 19,613$  vs.  $0,000 \pm 0,000$  copias mRNA ( $p = 0,03$ )], más DR1 [ $0,00585 \pm 0,0751$  vs.  $0,00459 \pm 0,0061$  copias mRNA ( $p = 0,049$ )] y más CRHR [ $0,2129 \pm 0,476$  vs.  $0,000 \pm 0,000$  copias mRNA ( $p = 0,037$ )] que los que no presentan hiperhidrosis. Los pacientes con SAHOS expresan más POMC [ $2,4982 \pm 3,3640$  vs.  $0,01428 \pm 0,0130$  copias mRNA ( $p = 0,027$ )]. Aquellos con artrosis presentan menos SST<sub>3</sub> [ $0,00156 \pm 0,0016$  vs.  $0,00421 \pm 0,011228$  copias mRNA ( $p = 0,037$ )] y los que tienen artralgias expresan menos SST<sub>3</sub> [ $0,00606 \pm 0,0139$  vs.  $0,0022 \pm 0,0068$  copias mRNA ( $p = 0,033$ )] y más DR1 [ $0,04488 \pm 0,7219$  vs.  $0,01139 \pm 0,02968$  copias mRNA ( $p = 0,049$ )]. No existen diferencias en otros síntomas o signos al diagnóstico.

Existe una correlación inversa entre la edad al diagnóstico y la talla [ $Rho = -0,637$  ( $p = 0,011$ )] y una correlación directa con la glucosa basal [ $Rho = 0,565$  ( $p = 0,008$ )]. También existe una correlación inversa entre la edad al diagnóstico y los niveles de GH plasmáticos [ $Rho = -0,489$  ( $p = 0,028$ )] e IGF-1 [ $Rho = -0,566$  ( $p = 0,008$ )] post cirugía. Los niveles de glucosa basal se correlacionan de forma directa con el índice de Knosp [ $Rho = 0,595$  ( $p = 0,015$ )]. Los niveles de colesterol total basal, y los de LDL-c se correlacionan de forma directa con SST<sub>2</sub> [ $Rho = 0,668$  ( $p = 0,002$ ) y [ $Rho = 0,624$  ( $p = 0,006$ ) respectivamente]; mientras que HDL-c se correlaciona con AVPR1b [ $Rho = 0,822$  ( $p = 0,001$ )] y de forma inversa con los niveles de IGF-1 post cirugía [ $Rho = -0,520$  ( $p = 0,027$ )]. Los triglicéridos se correlacionaron con los niveles de GHSR1a [ $Rho = 0,767$  ( $p = 0,002$ )].

Los niveles de cortisol plasmático se relacionan de forma inversa con IGF-1 [Rho = -0,363 (p = 0,015)] y de forma directa con la expresión de TSH en el tumor [Rho = 0,634 (p = 0,036)], SST<sub>2</sub> [Rho = 0,557 (p = 0,038)], SST<sub>3</sub> [Rho = 0,586 (p = 0,028)], SST<sub>5</sub> [Rho = 0,574 (p = 0,032)], DR2L [Rho = 0,603 (p = 0,038)], GnRHR [Rho = 0,646 (p = 0,032)], GHRHR [Rho = 0,643 (p = 0,033)], y AVPR1b [Rho = 0,634 (p = 0,036)]. Los niveles plasmáticos de PRL se correlacionan de forma inversa con el DAP [Rho = -0,502 (p = 0,034)] y DID [Rho = -0,515 (p = 0,035)]. La TSH plasmática se correlaciona de forma inversa con los niveles de GH [Rho = -0,477 (p = 0,039)] y con IGF-1 [Rho = -0,544 (p = 0,011)] y de forma directa con GHRHR [Rho = 0,541 (p = 0,046)].

Tanto LH como FSH se correlacionaron de forma directa con POMC [Rho = 0,770 (p = 0,001) y Rho = 0,632 (p = 0,015) respectivamente] y con GnRHR [Rho = 0,747 (p = 0,001), Rho 0,610 (p = 0,021) respectivamente].

Los pacientes tratados precirugía con SSA expresan menos GHSR1a (0,0115 ± 0,0121 vs. 0,1601 ± 0,1571) que los que no había recibido tratamiento (p = 0,017).

Los pacientes que están controlados bioquímicamente tienen más receptores DR2T que los que no están controlados [Z = -2,345; p = 0,019], DR2L [Z = -2,067 (p = 0,039)] y más GnRHR [Z = -2,429; p = 0,015]. No hay diferencias en la cuantificación de receptores de aquellos que se curan quirúrgicamente o que se controlan clínicamente.

## 6. DISCUSIÓN





## 6 DISCUSIÓN

Se han estudiado distintos factores para predecir los resultados quirúrgicos y la respuesta al tratamiento en la acromegalia, que incluyen la experiencia del cirujano, la edad, el tamaño del tumor, los niveles preoperatorios de GH e IGF-1, la expresión de SST<sub>2</sub>, la densidad de la granulación del adenoma y la intensidad del tumor en T2 [67, 87, 142, 145-147]. Sin embargo, no todos los factores han demostrado su influencia de forma consistente y existe gran controversia en la literatura sobre qué factores son sólidamente predictivos. Además, con el concepto de tratamiento personalizado de la acromegalia, es necesario contar con predictores precisos. Concretamente el estudio de la información derivada de las imágenes radiológicas de los tumores hipofisarios, más allá de sus características puramente morfológicas, y su relación con parámetros clínicos y moleculares está despertando un interés creciente en los últimos años, algo que es particularmente notable en el caso de los somatotropinomas causantes de acromegalia (26-59).

En este contexto, el objetivo principal del presente estudio fue determinar la posible relación entre las características clínico-patológicas y radiológicas de los pacientes al diagnóstico de la acromegalia y la expresión de distintos receptores moleculares a nivel tumoral. Para ello, mediante un abordaje pluridisciplinar diseñamos un estudio observacional retrospectivo en el cual, por una parte, planteamos un exhaustivo fenotipado clínico y radiológico de una cohorte de 22 pacientes con acromegalia diagnosticados en el servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Reina Sofía, que se intervinieron quirúrgicamente, y sobre las piezas de tejido tumoral se realizó un estudio molecular en colaboración con en el laboratorio del grupo de “Hormonas y Cáncer” del IMIBIC.

Este tipo de estudio podría ayudar a determinar la capacidad de los datos clínicos y radiológicos para predecir ciertas características del perfil de expresión del tumor, que de esta forma podrían servir como indicadores más precisos para diseñar los tratamientos más eficaces para disminuir los niveles de GH, y así, reducir la morbimortalidad de la enfermedad, pues en distintos estudios se ha puesto de

manifiesto que los pacientes acromegálicos con GH por debajo de 2,5 ng/L tienen unas tasas de mortalidad cercanas al nivel esperado para la población general [7, 75, 77-79]. En este sentido, la eficacia del tratamiento pre-quirúrgico de la acromegalia con SSA para normalizar los niveles de GH e IGF-1 y aliviar los síntomas está aún por demostrar de manera inequívoca [148]. Algunos estudios muestran que el tratamiento con SSA previo a la cirugía consigue tasas mayores de remisión que en los pacientes no tratados; sin embargo, otros estudios no confirman estos hallazgos [20, 30]. En nuestra serie, el 62,5 % fueron tratados con SSA (22 % octreótida y 9 % lanreótida), el 9,4 % con cabergolina y el resto con un tratamiento combinado de SSA y cabergolina (28,1 %) o SSA y pegvisomant (3,1 %), y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la curación quirúrgica o el control bioquímico, entre aquellos que recibieron tratamiento con SSA antes de la cirugía, y los que no lo recibieron. Estas diferencias entre la eficacia de los SSA en la curación quirúrgica o el control bioquímico de los pacientes con acromegalia pueden deberse al perfil molecular concreto que muestra el tumor en cada paciente y, por lo tanto, la identificación de parámetros clínicos que permitan predecir el patrón molecular de expresión del adenoma concreto podría ser de utilidad.

En nuestra serie, el 59,1 % fueron mujeres, hecho que se repite en la mayoría de series españolas como el REA o el estudio Acropaxis que describen prevalencias del 60,8 % y 59,8 % respectivamente [7, 10]. No hay una explicación para este hecho, pues en la mayoría de las series internacionales no hay diferencia entre hombres y mujeres (Hombres: 0,2 -1 /100.000 habitantes/año; Mujeres: 0,3-1,2 /100.000 habitantes/año [6]).

En esta cohorte, la prevalencia de síntomas y signos fueron muy similares a las descritas en la literatura [29]. No existen diferencias en las manifestaciones clínicas de la acromegalia entre sexos, salvo que la cefalea es más prevalente en las mujeres que en los hombres, hecho que se repite en la población sin acromegalia [149]. Los niveles de expresión de los receptores en el adenoma no se correlacionaron con las medidas de IGF-1 o de GH sérica después de la SOG, que son las pruebas que confirman el diagnóstico de acromegalia. Sin embargo, ciertas características comunes entre los pacientes con acromegalia como son artralgias o artrosis presentan menos expresión de

SST<sub>3</sub>, lo que puede hacer que estos pacientes respondan menos al tratamiento con pasireótida, que es un análogo de somatostatina 40 veces más afín a los SSTs que la octreótida [111] y con alta afinidad por SST<sub>5</sub>, pero también a por SST<sub>1</sub>, SST<sub>2</sub> y SST<sub>3</sub>.

En nuestro estudio, los adenomas con crecimiento extraselar y concretamente aquellos con crecimiento supraselar tienen mayor expresión de SST<sub>3</sub>, por lo que pasireótida podría ser una alternativa terapéutica en pacientes con macroadenomas con crecimiento extra/supraselar. Los niveles de colesterol total basal, y los de LDL-c se correlacionan de forma directa con SST<sub>2</sub>, lo que sugiere que los pacientes con hipercolesterolemia se podrían beneficiar mejor del tratamiento con octreótida o lanreótida.

Por su parte, es bien conocido que los DA pueden reducir la secreción hormonal y el tamaño en distintos tipos de adenomas hipofisarios, incluidos ciertos somatotropinomas [97]. De hecho, estudios previos han mostrado que, en los somatotropinomas, los niveles de DR2 se han correlacionado positivamente con la supresión de prolactina y de GH inducida por DA [118]. En nuestra serie, los pacientes con alteraciones visuales (cuadrantanopsia y hemianopsia) expresan menos DR4 y DR1 que los que no presentan alteraciones visuales; y aquellos con hiperhidrosis y/o artrosis tienen más DR1. Sin embargo, en la actualidad, no existe ningún fármaco que específicamente actúe sobre estos receptores. Aquellos pacientes con crecimiento supraselar también expresan más DR4, por lo que probablemente sea interesante el estudio de este receptor como diana para el tratamiento de estos pacientes.

Resulta interesante observar que los niveles de cortisol plasmático se relacionan de forma directa con la expresión de SST<sub>2</sub>, SST<sub>3</sub>, SST<sub>5</sub> y DR2L en los somatotropinomas estudiados. Es bien conocida la capacidad de los corticoides para regular la expresión de distintas hormonas y receptores hipofisarios a través de su receptor nuclear, y en particular, su influencia sobre la regulación de las células somatotropas y la secreción de GH tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [150]. Todo ello invita a profundizar en el futuro en el conocimiento de las relaciones entre estos niveles plasmáticos de cortisol y la regulación de receptores con elevada relevancia clínica. De hecho, cabe sugerir que, en estos pacientes, por el perfil molecular de receptores

observado se podría plantear un tratamiento con pasireótida y DA de forma combinada. Por el contrario, los niveles de cortisol plasmático se relacionan de forma inversa con IGF-1 lo que sugeriría que en pacientes con niveles de IGF-1 muy altos antes de la cirugía, no serían eficaces los DA, ya que la respuesta a este fármaco es mejor en aquellos pacientes que expresan altos niveles de DR2 [118].

En nuestra serie existe una correlación inversa entre la edad al diagnóstico y la talla, hecho lógico pues cuando más tarde es el diagnóstico más posibilidad de que los cartílagos de crecimiento estén cerrados y, por tanto, de que no haya un aumento de la talla. También existe una correlación inversa entre la edad al diagnóstico y los niveles de GH plasmáticos, hecho también plausible pues en distintos estudios se ha puesto de manifiesto que los pacientes más jóvenes y aquellos con mayores niveles de GH/IGF-1 tienen peor respuesta al tratamiento [151]. Aunque los pacientes que se controlaban bioquímicamente tendían a ser mayores ( $42,95 \pm 15,08$  años de media) que los que no ( $34,86 \pm 9,97$  años), las diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente por el tamaño de nuestra serie.

Un objetivo esencial de nuestro estudio fue determinar si existía una relación entre la señal en T2 del adenoma hipofisario y las características clínico-patológicas de los pacientes al diagnóstico de la acromegalia y/o con la expresión génica de distintos receptores a nivel tumoral. En esta serie, hay una alta proporción de adenomas hiperintensos (58,8 %), y ninguno hipointenso, lo cual contrasta con lo descrito en la mayoría de las series, donde estos últimos suponen entre el 27-50 % de los adenomas [66-69]. Probablemente estas diferencias pueden obedecer a las distintas definiciones que se asignan a la intensidad de la señal en T2 entre los trabajos publicados. En nuestro trabajo, al igual que en el de Potorac *et al.* [69] la señal en T2 del adenoma se clasificó como hipo-, iso-, o hiper-intenso comparándolo con el tejido normal hipofisario; y cuando el tejido hipofisario no era visible, la señal del adenoma se comparó con la sustancia gris del lóbulo temporal. En cambio, otros estudios la hiperintensidad en T2 se definió como una mayor intensidad que la sustancia gris, la hipointensidad en T2 como una menor intensidad que la sustancia blanca; y la isointensidad como el rango que quedaba entre la señal de la sustancia blanca y gris [66, 67, 145]. En nuestra serie, los

adenomas hiperintensos en T2 tendían a ser más grandes, sobre todo en el DIP y a ser más invasivos, pues tenían un índice de Knosp mayor; de hecho, todos los adenomas hiperintensos en T2 presentaban crecimiento extraselar, y en concreto el 90% crecimiento supraselar. La invasión de senos cavernosos era también más frecuente en los adenomas hiperintensos en T2 que en los isointensos (42,9 %). Estas características son concordantes con otros estudios publicados [67]. Este hecho sugiere que los adenomas hiperintensos en T2 son potencialmente más proliferativos que los que no son hiperintensos. Además, los adenomas hiperintensos en T2 tendían a tener niveles más altos de IGF-1 y un nadir menor de GH tras SOG que los adenomas isointensos. Sin embargo, en el estudio de Heck *et al.* [67] encuentran que los adenomas hiperintensos en T2 tienden a ser más grandes, pero segretan menos GH, y por tanto los niveles de IGF-1 son menores, hecho que no pueden explicar. En este estudio todos los adenomas escasamente granulados eran hiperintensos y, de hecho, la intensidad en T2 y el patrón de granulación estaban relacionados. Esta correlación es interesante porque a diferencia de la clasificación histológica, la intensidad de T2 está disponible en pacientes recién diagnosticados.

En el estudio molecular se pone de manifiesto que los adenomas con crecimiento extraselar presentan mayor expresión de SST<sub>3</sub> y mayor expresión de Ki67. Estos hallazgos no están previamente publicados. Más concretamente aquellos con crecimiento supraselar tienen mayor expresión de SST<sub>3</sub>, DR4 y DR5 que aquellos sin crecimiento supraselar. Los adenomas con invasión de senos cavernosos también expresan más DR5 que aquellos sin invasión. Estos resultados sugieren que la expresión de DR5 podría ser un marcador de invasión y debería ser objeto de un estudio más detallado, en particular por sus posibles implicaciones terapéuticas. Por su parte, los adenomas hiperintensos en T2, tienen mayor expresión de DR5 y Ki67 que aquellos isointensos; y tienden a tener mayor expresión de SST<sub>3</sub>. Esta mayor expresión de DR5 y Ki 67 de los tumores hiperintensos, junto con el hecho de que sean más grandes e invasivos, apoyan el hecho de que DR5 pueda ser un marcador de mal pronóstico, pues Ki67 es un conocido marcador de proliferación. Otro hecho que apoya esta idea es que la expresión de DR5 se correlaciona de forma directa con los diámetros DAP y DIP, y también existe una correlación directa entre el índice de Knosp y la expresión de DR5 y

de SST<sub>3</sub>. Aún más, el índice de proliferación Ki67 se correlacionó de forma directa con la expresión de DR5, SST<sub>2</sub> y SST<sub>3</sub>. Estos datos tampoco se han descrito anteriormente y sugieren la posibilidad de que la expresión de estos marcadores moleculares pueda tener implicaciones terapéuticas desde el diagnóstico de la enfermedad. Así, se puede sugerir que, según los datos de nuestro estudio, los tumores somatotrópicos más grandes y con peor pronóstico quirúrgico de curación podrían ser tratados con agonistas del receptor 5 de la dopamina y/o pasireótida, por la expresión de DR5 y de SST<sub>3</sub>.

En distintos estudios se ha puesto de manifiesto que la intensidad en T2 puede ayudar a predecir la puesta al tratamiento primario con SSA [152]. En el análisis post-hoc del estudio PRIMARYS se pone de manifiesto que la intensidad en T2 de los macroadenomas productores de GH no tratados previamente puede ayudar a predecir la respuesta a tratamiento con lanreótida. En este estudio, la intensidad en T2 no se correlaciona con el control bioquímico, pero sí con la respuesta tumoral entendida como la disminución del volumen tumoral en al menos un 20 %). El mecanismo exacto que explica la relación entre la intensidad en T2 y la respuesta a SSA no se comprende completamente, se podría explicar porque los adenomas densamente granulados, que se caracterizan por ser hipointensos en RMN, se asocian a un aumento de la expresión de SST<sub>2</sub>, y por tanto, a una mejor respuesta a Lanreótida [152]. Del mismo modo, la baja respuesta a SSA de los adenomas escasamente granulados, que son hiperintensos en T2, se han asociado con baja expresión de SST<sub>2</sub> y baja inmunoreactividad de E-cadherina [110].

Por otro lado, en el estudio de Coopmans *et al.* se pone de manifiesto que la respuesta a pasireótida está directamente relacionada a la no respuesta bioquímica con SSA de primera generación y a una baja expresión de receptores SST<sub>2</sub>. De hecho, la hiperintensidad en T2 se asoció con una mejor respuesta bioquímica tras tres meses de tratamiento con pasireótida [153]. El tratamiento con pasireótida se asoció a un aumento de intensidad en T2, probablemente por degeneración quística o necrosis de las células tumorales. [154]

Un objetivo adicional de nuestro estudio fue evaluar si la expresión de receptores de somatostatina y de dopamina en el adenoma puede predecir la curación o recidiva de la acromegalia. En nuestra serie, el 27,8 % de pacientes están curados quirúrgicamente, el

66,7 % están controlados bioquímicamente y el 94,4 % controlados clínicamente. Nuestros datos indican que los pacientes que poseen mayores niveles de expresión del DR2T en los adenomas muestran una correlación con un mejor control bioquímico de los pacientes, lo que concuerda con estudios previos que indican que la respuesta a octreótida es mejor en aquellos adenomas que expresan niveles altos de DR2 [119].

Nuestro estudio tiene como principal limitación el número de pacientes, que si bien es insuficiente para emitir conclusiones definitivas e inequívocas, sí que ha permitido realizar un análisis exploratorio muy detallado, informativo y original, que abre nuevas vías de investigación en esta compleja patología. Otra de las limitaciones de nuestro estudio es no disponer del patrón de granulación de los adenomas.

Por todo lo anterior, consideramos que deben abordarse estudios futuros en los que se incluyan un mayor número de pacientes con el objeto de permitir confirmar los resultados obtenidos en este estudio y que permitan además descubrir nuevas relaciones clínicas y moleculares con el fin último de encontrar vías más efectivas y novedosas en el tratamiento farmacológico de los pacientes con acromegalia.





## 7. CONCLUSIONES



## 7 CONCLUSIONES

- Existe una correlación entre parámetros clínicos pre-quirúrgico y la expresión de ciertos receptores de somatostatina y dopamina en la pieza tumoral de los pacientes con acromegalia. Estos datos iniciales sugieren la posibilidad de que determinados parámetros clínicos pudieran predecir el patrón molecular de los adenomas somatotropos, lo que, a su vez, ayudaría a seleccionar tratamientos médicos pre-quirúrgicos más dirigidos y posiblemente eficaces.
- Los pacientes controlados bioquímicamente después de la cirugía presentaban una mayor expresión de receptores DR2 que los que no estaban controlados. Este hecho es plausible, debido a que la respuesta a octeótrida es mejor en aquellos adenomas que expresan niveles altos de DR2.
- Los adenomas hipofisarios productores de GH hiperintensos en T2 son más grandes y tienden a ser más agresivos, tanto por la invasión de zonas adyacentes, como por la expresión de marcadores moleculares (mayor expresión de DR5 y Ki67), y por tanto tienen mayores niveles de IGF-1. Un estudio de imagen exhaustivo prequirúrgico puede ayudar a elegir el tratamiento idóneo antes de la cirugía.



## 8. BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

1. Shlomo Melmed MBChB MACP, K.S.P.M., P. Reed Larsen MD FRCP, Henry M. Kronenberg MD, Williams. *Tratado De Endocrinología*. . 2017.
2. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>.
3. Lloyd R, O.R., Klöppel G, Rosai J., *WHO Classification of tumours of endocrine organs*. 4 ed. Vol. 10. 2017, Ginebra: World Health Organization. 355.
4. Pico, A., et al., *Recommendations on the pathological report of pituitary tumors. A consensus of experts of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition and the Spanish Society of Pathology*. *Endocrinol Diabetes Nutr*, 2021. **68**(3): p. 196-207.
5. Villa, C., et al., *A standardised diagnostic approach to pituitary neuroendocrine tumours (PitNETs): a European Pituitary Pathology Group (EPPG) proposal*. *Virchows Arch*, 2019. **475**(6): p. 687-692.
6. Lavrentaki, A., et al., *Epidemiology of acromegaly: review of population studies*. *Pituitary*, 2017. **20**(1): p. 4-9.
7. Mestron, A., et al., *Epidemiology, clinical characteristics, outcome, morbidity and mortality in acromegaly based on the Spanish Acromegaly Registry (Registro Espanol de Acromegalia, REA)*. *Eur J Endocrinol*, 2004. **151**(4): p. 439-46.
8. Etxabe, J., et al., *Acromegaly: an epidemiological study*. *J Endocrinol Invest*, 1993. **16**(3): p. 181-7.
9. Holdaway, I.M. and C. Rajasoorya, *Epidemiology of acromegaly*. *Pituitary*, 1999. **2**(1): p. 29-41.
10. de Pablos-Velasco, P., et al., *Diagnosis, treatment and follow-up of patients with acromegaly in a clinical practice setting in Spain: the ACROPRAXIS program Delphi survey*. *Pituitary*, 2020. **23**(2): p. 129-139.
11. Ben-Shlomo, A. and S. Melmed, *Acromegaly*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2008. **37**(1): p. 101-22, viii.
12. Ben-Shlomo, A., et al., *Clinical, quality of life, and economic value of acromegaly disease control*. *Pituitary*, 2011. **14**(3): p. 284-94.
13. Lamas, C., et al., *Silent somatotropinomas*. *Minerva Endocrinol*, 2019. **44**(2): p. 137-142.
14. Gadelha, M.R., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in two families with acromegaly/gigantism is independent of mutations of the multiple endocrine neoplasia type I gene*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(1): p. 249-56.
15. Vierimaa, O., et al., *Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene*. *Science*, 2006. **312**(5777): p. 1228-30.
16. Daly, A.F., et al., *Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(5): p. 1891-6.
17. Trivellin, G., et al., *Gigantism and acromegaly due to Xq26 microduplications and GPR101 mutation*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(25): p. 2363-74.
18. Hannah-Shmouni, F., G. Trivellin, and C.A. Stratakis, *Genetics of gigantism and acromegaly*. *Growth Horm IGF Res*, 2016. **30-31**: p. 37-41.
19. Zhu, X., et al., *Genetic control of pituitary development and hypopituitarism*. *Curr Opin Genet Dev*, 2005. **15**(3): p. 332-40.

20. Melmed, S., *Acromegaly pathogenesis and treatment*. J Clin Invest, 2009. **119**(11): p. 3189-202.
21. Tannenbaum, G.S., J. Epelbaum, and C.Y. Bowers, *Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion*. Endocrinology, 2003. **144**(3): p. 967-74.
22. Brown, R.J., et al., *Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(9): p. 814-21.
23. Lanning, N.J. and C. Carter-Su, *Recent advances in growth hormone signaling*. Rev Endocr Metab Disord, 2006. **7**(4): p. 225-35.
24. Conway-Campbell, B.L., et al., *The extracellular domain of the growth hormone receptor interacts with coactivator activator to promote cell proliferation*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(9): p. 2190-202.
25. Maile, L.A., et al., *Insulin-like growth factor-I signaling in smooth muscle cells is regulated by ligand binding to the 177CYDMKTTC184 sequence of the beta3-subunit of alphaVbeta3*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(2): p. 405-13.
26. Clemmons, D.R., *Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships*. Endocr Rev, 2001. **22**(6): p. 800-17.
27. Kim, H., et al., *Intact insulin and insulin-like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function in vivo*. Endocrinology, 2005. **146**(4): p. 1772-9.
28. Cordido, F., et al., *[Practical guidelines for diagnosis and treatment of acromegaly. Grupo de Neuroendocrinología de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición]*. Endocrinol Nutr, 2013. **60**(8): p. 457 e1-457 e15.
29. Vilar, L., et al., *Acromegaly: clinical features at diagnosis*. Pituitary, 2017. **20**(1): p. 22-32.
30. Melmed, S., et al., *Guidelines for acromegaly management: an update*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(5): p. 1509-17.
31. Reid, T.J., et al., *Features at diagnosis of 324 patients with acromegaly did not change from 1981 to 2006: acromegaly remains under-recognized and under-diagnosed*. Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **72**(2): p. 203-8.
32. Rua Marín, C.L.S., G; Campuzano Maya, G., *Diagnóstico de acromegalia*. Medicina y Laboratorio, 2011. **17**(11): p. 511-531.
33. Katznelson, L., et al., *Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(11): p. 3933-51.
34. Chanson, P. and S. Salenave, *Acromegaly*. Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 17.
35. Abreu, A., et al., *Challenges in the diagnosis and management of acromegaly: a focus on comorbidities*. Pituitary, 2016. **19**(4): p. 448-57.
36. Vilar, L., et al., *Substantial shrinkage of adenomas cosecreting growth hormone and prolactin with use of cabergoline therapy*. Endocr Pract, 2007. **13**(4): p. 396-402.
37. Ben-Shlomo, A. and S. Melmed, *Skin manifestations in acromegaly*. Clin Dermatol, 2006. **24**(4): p. 256-9.
38. Miller, A., et al., *Impact of musculoskeletal disease on quality of life in long-standing acromegaly*. Eur J Endocrinol, 2008. **158**(5): p. 587-93.
39. Kropf, L.L., et al., *Functional evaluation of the joints in acromegalic patients and associated factors*. Clin Rheumatol, 2013. **32**(7): p. 991-8.
40. Mazziotti, G., et al., *Vertebral fractures in patients with acromegaly: a 3-year prospective study*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(8): p. 3402-10.
41. Zoicas, F., et al., *Screening for Acromegaly in Patients with Carpal Tunnel Syndrome: A Prospective Study (ACROCARP)*. Horm Metab Res, 2016. **48**(7): p. 452-6.
42. Webb, S.M., *Quality of life in acromegaly*. Neuroendocrinology, 2006. **83**(3-4): p. 224-9.



43. Dantas, R.A., et al., *Physical activities in daily life and functional capacity compared to disease activity control in acromegalic patients: impact in self-reported quality of life*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2013. **57**(7): p. 550-7.
44. Capatina, C. and J.A. Wass, *60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Acromegaly*. J Endocrinol, 2015. **226**(2): p. T141-60.
45. Colao, A., et al., *Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management*. Endocr Rev, 2004. **25**(1): p. 102-52.
46. van Haute, F.R., et al., *Prevalence of sleep apnea and metabolic abnormalities in patients with acromegaly and analysis of cephalometric parameters by magnetic resonance imaging*. Eur J Endocrinol, 2008. **158**(4): p. 459-65.
47. Vilar, L., et al., *Increase of classic and nonclassic cardiovascular risk factors in patients with acromegaly*. Endocr Pract, 2007. **13**(4): p. 363-72.
48. Espinosa-de-los-Monteros, A.L., et al., *Clinical and biochemical characteristics of acromegalic patients with different abnormalities in glucose metabolism*. Pituitary, 2011. **14**(3): p. 231-5.
49. Bondanelli, M., M.R. Ambrosio, and E.C. degli Uberti, *Pathogenesis and prevalence of hypertension in acromegaly*. Pituitary, 2001. **4**(4): p. 239-49.
50. Mosca, S., et al., *Cardiovascular involvement in patients affected by acromegaly: an appraisal*. Int J Cardiol, 2013. **167**(5): p. 1712-8.
51. dos Santos Silva, C.M., et al., *Low Frequency of Cardiomyopathy Using Cardiac Magnetic Resonance Imaging in an Acromegaly Contemporary Cohort*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(12): p. 4447-55.
52. Yedinak, C.G. and M. Flieseriu, *Self-perception of cognitive function among patients with active acromegaly, controlled acromegaly, and non-functional pituitary adenoma: a pilot study*. Endocrine, 2014. **46**(3): p. 585-93.
53. Manara, R., et al., *Increased rate of intracranial saccular aneurysms in acromegaly: an MR angiography study and review of the literature*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(5): p. 1292-300.
54. Manara, R., et al., *Herniation of cerebellar tonsils in acromegaly: prevalence, pathogenesis and clinical impact*. Pituitary, 2013. **16**(1): p. 122-30.
55. Carvalho, M.A., et al., *Sensorineural hearing loss in acromegalic patients under treatment*. Braz J Otorhinolaryngol, 2012. **78**(4): p. 98-102.
56. Glezer, A. and M.D. Bronstein, *Pituitary apoplexy: pathophysiology, diagnosis and management*. Arch Endocrinol Metab, 2015. **59**(3): p. 259-64.
57. Fraser, L.A., et al., *Remission of acromegaly after pituitary apoplexy: case report and review of literature*. Endocr Pract, 2009. **15**(7): p. 725-31.
58. Dutta, P., et al., *Colonic neoplasia in acromegaly: increased proliferation or decreased apoptosis?* Pituitary, 2012. **15**(2): p. 166-73.
59. Wolinski, K., A. Czarnywojtek, and M. Ruchala, *Risk of thyroid nodular disease and thyroid cancer in patients with acromegaly--meta-analysis and systematic review*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88787.
60. Reverter, J.L., et al., *Benign and malignant nodular thyroid disease in acromegaly. Is a routine thyroid ultrasound evaluation advisable?* PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104174.
61. dos Santos, M.C., et al., *Thyroid cancer in patients with acromegaly: a case-control study*. Pituitary, 2013. **16**(1): p. 109-14.
62. Boguszewski, C.L. and J. Ayuk, *MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Acromegaly and cancer: an old debate revisited*. Eur J Endocrinol, 2016. **175**(4): p. R147-56.
63. Kannan, S. and L. Kennedy, *Diagnosis of acromegaly: state of the art*. Expert Opin Med Diagn, 2013. **7**(5): p. 443-53.
64. Giustina, A., et al., *A consensus on criteria for cure of acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(7): p. 3141-8.

65. Lugo, G., L. Pena, and F. Cordido, *Clinical manifestations and diagnosis of acromegaly*. *Int J Endocrinol*, 2012. **2012**: p. 540398.
66. Hagiwara, A., et al., *Comparison of growth hormone-producing and non-growth hormone-producing pituitary adenomas: imaging characteristics and pathologic correlation*. *Radiology*, 2003. **228**(2): p. 533-8.
67. Heck, A., et al., *Intensity of pituitary adenoma on T2-weighted magnetic resonance imaging predicts the response to octreotide treatment in newly diagnosed acromegaly*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2012. **77**(1): p. 72-8.
68. Bakhtiar, Y., et al., *Geometric survey on magnetic resonance imaging of growth hormone producing pituitary adenoma*. *Pituitary*, 2014. **17**(2): p. 142-9.
69. Potorac, I., et al., *Pituitary MRI characteristics in 297 acromegaly patients based on T2-weighted sequences*. *Endocr Relat Cancer*, 2015. **22**(2): p. 169-77.
70. Kimmell, K.T., R.J. Weil, and N.F. Marko, *Multi-modal management of acromegaly: a value perspective*. *Pituitary*, 2015. **18**(5): p. 658-65.
71. Colao, A., et al., *Could different treatment approaches in acromegaly influence life expectancy? A comparative study between Bulgaria and Campania (Italy)*. *Eur J Endocrinol*, 2014. **171**(2): p. 263-73.
72. Melmed, S., *Pituitary Medicine From Discovery to Patient-Focused Outcomes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016. **101**(3): p. 769-77.
73. Cuevas-Ramos, D., et al., *A structural and functional acromegaly classification*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(1): p. 122-31.
74. Colao, A., et al., *Acromegaly*. *Nat Rev Dis Primers*, 2019. **5**(1): p. 20.
75. Holdaway, I.M., R.C. Rajasoorya, and G.D. Gamble, *Factors influencing mortality in acromegaly*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(2): p. 667-74.
76. Boguszewski, M. and A.A. Cardoso-Demartini, *MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Growth and growth hormone therapy in short children born preterm*. *Eur J Endocrinol*, 2017. **176**(3): p. R111-R122.
77. Holdaway, I.M., M.J. Bolland, and G.D. Gamble, *A meta-analysis of the effect of lowering serum levels of GH and IGF-I on mortality in acromegaly*. *Eur J Endocrinol*, 2008. **159**(2): p. 89-95.
78. Sesmilo, G., *[Epidemiology of acromegaly in Spain]*. *Endocrinol Nutr*, 2013. **60**(8): p. 470-4.
79. Sherlock, M., et al., *Mortality in patients with pituitary disease*. *Endocr Rev*, 2010. **31**(3): p. 301-42.
80. Ayuk, J., et al., *Growth hormone and pituitary radiotherapy, but not serum insulin-like growth factor-I concentrations, predict excess mortality in patients with acromegaly*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(4): p. 1613-7.
81. Bogazzi, F., et al., *Comparison of the effects of primary somatostatin analogue therapy and pituitary adenectomy on survival in patients with acromegaly: a retrospective cohort study*. *Eur J Endocrinol*, 2013. **169**(3): p. 367-76.
82. Mercado, M., et al., *Successful mortality reduction and control of comorbidities in patients with acromegaly followed at a highly specialized multidisciplinary clinic*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. **99**(12): p. 4438-46.
83. Wu, T.E., et al., *The role of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in the mortality of patients with acromegaly after trans-sphenoidal surgery*. *Growth Horm IGF Res*, 2010. **20**(6): p. 411-5.
84. Sherlock, M., et al., *ACTH deficiency, higher doses of hydrocortisone replacement, and radiotherapy are independent predictors of mortality in patients with acromegaly*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(11): p. 4216-23.
85. Bolfi, F., et al., *Mortality in acromegaly decreased in the last decade: a systematic review and meta-analysis*. *Eur J Endocrinol*, 2018. **179**(1): p. 59-71.

86. Sesmilo, G., et al., *Changes in acromegaly treatment over four decades in Spain: analysis of the Spanish Acromegaly Registry (REA)*. Pituitary, 2013. **16**(1): p. 115-21.
87. Nomikos, P., M. Buchfelder, and R. Fahlbusch, *The outcome of surgery in 668 patients with acromegaly using current criteria of biochemical 'cure'*. Eur J Endocrinol, 2005. **152**(3): p. 379-87.
88. Wang, Y.Y., et al., *Acromegaly surgery in Manchester revisited--the impact of reducing surgeon numbers and the 2010 consensus guidelines for disease remission*. Clin Endocrinol (Oxf), 2012. **76**(3): p. 399-406.
89. Chen, C.J., et al., *Microsurgical versus endoscopic transsphenoidal resection for acromegaly: a systematic review of outcomes and complications*. Acta Neurochir (Wien), 2017. **159**(11): p. 2193-2207.
90. Fleseriu, M., J.B. Delashaw, Jr., and D.M. Cook, *Acromegaly: a review of current medical therapy and new drugs on the horizon*. Neurosurg Focus, 2010. **29**(4): p. E15.
91. Bhayana, S., et al., *The implication of somatotroph adenoma phenotype to somatostatin analog responsiveness in acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(11): p. 6290-5.
92. Zhao, D., Y. Tomono, and T. Nose, *Expression of P27kip1 and Ki-67 in pituitary adenomas: an investigation of marker of adenoma invasiveness*. Acta Neurochir (Wien), 1999. **141**(2): p. 187-92.
93. Frara, S., et al., *The Modern Criteria for Medical Management of Acromegaly*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2016. **138**: p. 63-83.
94. Melmed, S., et al., *A Consensus Statement on acromegaly therapeutic outcomes*. Nat Rev Endocrinol, 2018. **14**(9): p. 552-561.
95. Colao, A., et al., *First-line therapy of acromegaly: a statement of the A.L.I.C.E. (Acromegaly primary medical treatment Learning and Improvement with Continuous Medical Education) Study Group*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(11): p. 1017-20.
96. Chin, S.O., et al., *Medical Treatment with Somatostatin Analogues in Acromegaly: Position Statement*. Endocrinol Metab (Seoul), 2019. **34**(1): p. 53-62.
97. Colao, A., et al., *Effect of different dopaminergic agents in the treatment of acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 518-23.
98. Sandret, L., P. Maison, and P. Chanson, *Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(5): p. 1327-35.
99. Giustina, A., et al., *Use of Pegvisomant in acromegaly. An Italian Society of Endocrinology guideline*. J Endocrinol Invest, 2014. **37**(10): p. 1017-30.
100. Colao, A., et al., *Interpreting biochemical control response rates with first-generation somatostatin analogues in acromegaly*. Pituitary, 2016. **19**(3): p. 235-47.
101. Colao, A., et al., *Pasireotide versus octreotide in acromegaly: a head-to-head superiority study*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(3): p. 791-9.
102. Gadelha, M.R., et al., *Pasireotide versus continued treatment with octreotide or lanreotide in patients with inadequately controlled acromegaly (PAOLA): a randomised, phase 3 trial*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014. **2**(11): p. 875-84.
103. Patel, Y.C., *Somatostatin and its receptor family*. Front Neuroendocrinol, 1999. **20**(3): p. 157-98.
104. van der Hoek, J., L.J. Hofland, and S.W. Lamberts, *Novel subtype specific and universal somatostatin analogues: clinical potential and pitfalls*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(12): p. 1573-92.
105. Gahete, M.D., et al., *Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes: lessons from comparative endocrinology*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1163**: p. 137-53.
106. Gunther, T., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature*. Pharmacol Rev, 2018. **70**(4): p. 763-835.

107. Wang, B., et al., *Differential involvement of signaling pathways in the regulation of growth hormone release by somatostatin and growth hormone-releasing hormone in orange-spotted grouper (Epinephelus coioides)*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **382**(2): p. 851-9.
108. Casarini, A.P., et al., *Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment*. Pituitary, 2009. **12**(4): p. 297-303.
109. Taboada, G.F., et al., *Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas*. Eur J Endocrinol, 2007. **156**(1): p. 65-74.
110. Cuevas-Ramos, D. and M. Fleseriu, *Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas*. J Mol Endocrinol, 2014. **52**(3): p. R223-40.
111. Bruns, C., et al., *SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile*. Eur J Endocrinol, 2002. **146**(5): p. 707-16.
112. Wolin, E.M., et al., *Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a long-acting release (LAR) formulation of pasireotide (SOM230) in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: results from a randomized, multicenter, open-label, phase I study*. Cancer Chemother Pharmacol, 2013. **72**(2): p. 387-95.
113. Bevan, J.S., *Clinical review: The antitumoral effects of somatostatin analog therapy in acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1856-63.
114. Melmed, S., et al., *A critical analysis of pituitary tumor shrinkage during primary medical therapy in acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(7): p. 4405-10.
115. Vieira, A.L. and S.L. Gomes, *Global gene expression analysis during sporulation of the aquatic fungus Blastocladiella emersonii*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(3): p. 415-23.
116. Missale, C., et al., *Dopamine receptors: from structure to function*. Physiol Rev, 1998. **78**(1): p. 189-225.
117. Renner, U., et al., *Heterogeneous dopamine D2 receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in clinically nonfunctioning pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(4): p. 1368-75.
118. Ferone, D., et al., *Correlation of in vitro and in vivo somatotropic 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): p. 1412-7.
119. Saveanu, A. and P. Jaquet, *Somatostatin-dopamine ligands in the treatment of pituitary adenomas*. Rev Endocr Metab Disord, 2009. **10**(2): p. 83-90.
120. Cantone, M.C., A. Dicitore, and G. Vitale, *Somatostatin-Dopamine Chimeric Molecules in Neuroendocrine Neoplasms*. J Clin Med, 2021. **10**(3).
121. Taboada, G.F., et al., *Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR*. Eur J Endocrinol, 2008. **158**(3): p. 295-303.
122. Neto, L.V., et al., *Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(6): p. 1931-7.
123. Mattar, P., M.R. Alves Martins, and J. Abucham, *Short- and long-term efficacy of combined cabergoline and octreotide treatment in controlling igf-I levels in acromegaly*. Neuroendocrinology, 2010. **92**(2): p. 120-7.
124. Giustina, A., et al., *Pegvisomant in acromegaly: an update*. J Endocrinol Invest, 2017. **40**(6): p. 577-589.

125. Loeffler, J.S. and H.A. Shih, *Radiation therapy in the management of pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(7): p. 1992-2003.
126. Langsenlehner, T., et al., *Long-term follow-up of patients with pituitary macroadenomas after postoperative radiation therapy: analysis of tumor control and functional outcome*. Strahlenther Onkol, 2007. **183**(5): p. 241-7.
127. Ayuk, J. and P.M. Stewart, *Mortality following pituitary radiotherapy*. Pituitary, 2009. **12**(1): p. 35-9.
128. Gandhi, C.D., et al., *The historical evolution of transsphenoidal surgery: facilitation by technological advances*. Neurosurg Focus, 2009. **27**(3): p. E8.
129. Jagannathan, J., et al., *Gamma knife radiosurgery for acromegaly: outcomes after failed transsphenoidal surgery*. Neurosurgery, 2008. **62**(6): p. 1262-9; discussion 1269-70.
130. Pollock, B.E., et al., *Radiosurgery of growth hormone-producing pituitary adenomas: factors associated with biochemical remission*. J Neurosurg, 2007. **106**(5): p. 833-8.
131. van der Lely, A.J., et al., *Development of ACRODAT((R)), a new software medical device to assess disease activity in patients with acromegaly*. Pituitary, 2017. **20**(6): p. 692-701.
132. Webb, S.M. and X. Badia, *Quality of Life in Acromegaly*. Neuroendocrinology, 2016. **103**(1): p. 106-11.
133. Webb, S.M., et al., *Validity and clinical applicability of the acromegaly quality of life questionnaire, AcroQoL: a 6-month prospective study*. Eur J Endocrinol, 2006. **155**(2): p. 269-77.
134. Geraedts, V.J., et al., *Predictors of Quality of Life in Acromegaly: No Consensus on Biochemical Parameters*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 40.
135. Caron, P.J., et al., *Tumor shrinkage with lanreotide Autogel 120 mg as primary therapy in acromegaly: results of a prospective multicenter clinical trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(4): p. 1282-90.
136. Caron, P.J., et al., *Effects of lanreotide Autogel primary therapy on symptoms and quality-of-life in acromegaly: data from the PRIMARYS study*. Pituitary, 2016. **19**(2): p. 149-57.
137. Lombardi, G., et al., *Efficacy of the new long-acting formulation of lanreotide (lanreotide Autogel) in somatostatin analogue-naive patients with acromegaly*. J Endocrinol Invest, 2009. **32**(3): p. 202-9.
138. Neggers, S.J., et al., *Quality of life in acromegalic patients during long-term somatostatin analog treatment with and without pegvisomant*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(10): p. 3853-9.
139. Trainer, P.J., et al., *A randomized, controlled, multicentre trial comparing pegvisomant alone with combination therapy of pegvisomant and long-acting octreotide in patients with acromegaly*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(4): p. 549-57.
140. Rowles, S.V., et al., *Quality of life (QOL) in patients with acromegaly is severely impaired: use of a novel measure of QOL: acromegaly quality of life questionnaire*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3337-41.
141. Ezzat, S., et al., *Predictive Markers for Post-Surgical Medical Management of Acromegaly: A Systematic Review and Consensus Treatment Guideline*. Endocr Pract, 2019.
142. Galm, B.P., et al., *MRI texture analysis in acromegaly and its role in predicting response to somatostatin receptor ligands*. Pituitary, 2020. **23**(3): p. 212-222.
143. Luque, R.M., S. Park, and R.D. Kineman, *Severity of the catabolic condition differentially modulates hypothalamic expression of growth hormone-releasing hormone in the fasted mouse: potential role of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone*. Endocrinology, 2007. **148**(1): p. 300-9.
144. Martinez-Fuentes, A.J., et al., *Ghrelin is produced by and directly activates corticotrope cells from adrenocorticotropin-secreting adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(6): p. 2225-31.

145. Puig-Domingo, M., et al., *Magnetic resonance imaging as a predictor of response to somatostatin analogs in acromegaly after surgical failure*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(11): p. 4973-8.
146. Brzana, J., et al., *Growth hormone granulation pattern and somatostatin receptor subtype 2A correlate with postoperative somatostatin receptor ligand response in acromegaly: a large single center experience*. Pituitary, 2013. **16**(4): p. 490-8.
147. Iacovazzo, D., et al., *Factors predicting pasireotide responsiveness in somatotroph pituitary adenomas resistant to first-generation somatostatin analogues: an immunohistochemical study*. Eur J Endocrinol, 2016. **174**(2): p. 241-50.
148. Losa, M. and J. Bollerslev, *Pros and cons in endocrine practice: pre-surgical treatment with somatostatin analogues in acromegaly*. Endocrine, 2016. **52**(3): p. 451-7.
149. Navarro-Perez, M.P., et al., *[Epidemiology of migraine in Spain and Latin America]*. Rev Neurol, 2020. **71**(3): p. 110-118.
150. Mazziotti, G. and A. Giustina, *Glucocorticoids and the regulation of growth hormone secretion*. Nat Rev Endocrinol, 2013. **9**(5): p. 265-76.
151. Coopmans, E.C., et al., *Multivariable Prediction Model for Biochemical Response to First-Generation Somatostatin Receptor Ligands in Acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(9).
152. Bonneville, F., et al., *MRI T2 signal intensity and tumor response in patients with GH-secreting pituitary macroadenoma: PRIMARYS post-hoc analysis*. Eur J Endocrinol, 2018.
153. Coopmans, E.C., et al., *T2-signal intensity, SSTR expression, and somatostatin analogs efficacy predict response to pasireotide in acromegaly*. Eur J Endocrinol, 2020. **182**(6): p. 595-605.
154. Coopmans, E.C., et al., *Potential antitumour activity of pasireotide on pituitary tumours in acromegaly*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2019. **7**(6): p. 425-426.

## 9. ANEXO





# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Association between radiological parameters and clinical and molecular characteristics in human somatotropinomas

Received: 24 July 2017  
Accepted: 9 March 2018  
Published online: 18 April 2018

María R. Alhambra-Expósito<sup>1,2,3</sup>, Alejandro Ibáñez-Costa<sup>1,2,4,5,6</sup>, Paloma Moreno-Moreno<sup>1,2,3</sup>, Esther Rivero-Cortés<sup>1,2,4,5,6</sup>, Mari C. Vázquez-Borrego<sup>1,2,4,5,6</sup>, Cristóbal Blanco-Acevedo<sup>1,2,7</sup>, Álvaro Toledano-Delgado<sup>1,2,7</sup>, María S. Lombardo-Galera<sup>8</sup>, Juan A. Vallejo-Casas<sup>8</sup>, Manuel D. Gahete<sup>1,2,4,5,6</sup>, Justo P. Castaño<sup>1,2,4,5,6</sup>, María A. Gálvez<sup>1,2,3</sup> & Raúl M. Luque<sup>1,2,4,5,6</sup>

Acromegaly is a rare but severe disease, originated in 95% of cases by a growth hormone-secreting adenoma (somatotropinoma) in the pituitary. Magnetic resonance imaging (MRI) is a non-invasive technique used for the diagnosis and prognosis of pituitary tumours. The aim of this study was to determine whether the use of T2-weighted signal intensity at MRI could help to improve the characterisation of somatotropinomas, by analysing its relationship with clinical/molecular features. An observational study was implemented in a cohort of 22 patients (mean age = 42.1 ± 17.2 years; 59% women; 95% size >10 mm). Suprasellar-extended somatotropinomas presented larger diameters vs. non-extended tumours. T2-imaging revealed that 59% of tumours were hyperintense and 41% isointense adenomas, wherein hyperintense were more invasive (according to Knosp-score) than isointense adenomas. A higher proportion of hyperintense somatotropinomas presented extrasellar-growth, suprasellar-growth and invasion of the cavernous sinus compared to isointense adenomas. Interestingly, somatostatin receptor-3 and dopamine receptor-5 (DRD5) expression levels were associated with extrasellar and/or suprasellar extension. Additionally, DRD5 was also higher in hyperintense adenomas and its expression was directly correlated with Knosp-score and with tumour diameter. Hence, T2-weighted MRI on somatotropinomas represents a potential tool to refine their diagnosis and prognosis, and could support the election of preoperative treatment, when required.

Acromegaly is a rare disease, with a prevalence of only 35–75 cases per million inhabitants, and an incidence of 3–4 cases per million inhabitants/year<sup>1,2</sup>. It is caused by over-production of growth hormone (GH), which in ~95% of cases is due to a pituitary adenoma (PA)<sup>3</sup>, usually presenting as a macroadenoma on diagnosis<sup>4</sup>. Magnetic resonance imaging (MRI) has greatly improved the success of clinical management in recent years and is now a key element in the diagnosis of patients with acromegaly. Thus, MRI is a non-invasive diagnostic test that can help to characterise GH-secreting adenomas and could aid to predict their clinical behavior. Specifically, some studies have suggested the existence of a relationship between the intensity of the adenoma on T2-weighted imaging and its characteristics<sup>5</sup>, pathology<sup>6–7</sup> and response to somatostatin analogues<sup>6,8</sup>. However, these studies were conducted in small series of PAs and the findings are still inconsistent and/or inconclusive, which could in part be also due to the characteristics of GH-secreting adenomas (i.e. unlike other PA types that are usually

<sup>1</sup>Maimonides Institute of Biomedical Research of Cordoba, Córdoba, 14004, Spain. <sup>2</sup>Reina Sofia University Hospital (HURS), Córdoba, 14004, Spain. <sup>3</sup>Service of Endocrinology and Nutrition, HURS, Córdoba, 14004, Spain. <sup>4</sup>Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universidad de Córdoba, Córdoba, 14004, Spain. <sup>5</sup>CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Córdoba, 14004, Spain. <sup>6</sup>Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Córdoba, 14004, Spain. <sup>7</sup>Service of Neurosurgery, HURS, Córdoba, 14004, Spain. <sup>8</sup>Radiology Service, HURS, Córdoba, 14004, Spain. Justo P. Castaño, María A. Gálvez and Raúl M. Luque contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P.C. (email: [justo@uco.es](mailto:justo@uco.es)) or M.A.G. (email: [mariaa.galvez.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:mariaa.galvez.sspa@juntadeandalucia.es)) or R.M.L. (email: [raul.luque@uco.es](mailto:raul.luque@uco.es))

Tumour size	≤10 mm	10–20 mm	>20 mm	P value
Number	1	12	9	—
Sex (♂/♀)	0 vs. 1	6 vs. 7	3 vs. 5	0.551
Age at diagnosis	36	41.55 ± 17.74	41.13 ± 19.28	0.961
IGF-1 (ng/dL)	500.43	568.49 ± 276.66	626.34 ± 307.09	0.673
Basal GH (ng/dL)	5.05	7.27 ± 8.07	11.39 ± 9.80	0.537
Nadir GH (ng/dL)	5.53	6.37 ± 7.88	12.00 ± 11.36	0.311

**Table 1.** Particular characteristics of GH-secreting adenomas stratified by maximum tumour diameter. GH-secreting adenomas were classified into 3 groups by maximum tumour diameter (less than 10 mm, between 10 and 20 mm, and greater than 20 mm) and demographic (sex and age at diagnosis) and clinical (levels of IGF-1 and basal and nadir GH after OGTT) parameters were evaluated.

Knosp score	0	1	2	3	4	P value
%	17.6%	17.6%	23.5%	11.8%	29.4%	—
Age (years)	35.67 ± 7.51	29.33 ± 14.50	29.50 ± 13.03	62.00 ± 15.56	47.40 ± 18.68	0.116
IGF-1 (ng/mL)	547.80 ± 116.25	423.18 ± 264.93	516.47 ± 300.18	493.05 ± 311.95	597.91 ± 401.64	0.956
Nadir GH (ng/mL)	11.41 ± 11.80	10.95 ± 9.32	9.79 ± 10.46	8.84 ± 7.98	8.75 ± 10.08	0.861
Sex (♂/♀)	3/1	1/3	3/3	0/2	2/4	0.067
APD (mm)	10.00 ± 4.58	15.20 ± 4.70	18.70 ± 3.50	16.90 ± 1.56	26.50 ± 5.54	0.004
TD (mm)	8.77 ± 2.85	17.87 ± 3.01	18.15 ± 4.57	17.65 ± 3.32	27.12 ± 9.36	0.022
CCD (mm)	11.10 ± 4.76	15.17 ± 4.76	16.97 ± 5.98	17.90 ± 4.38	29.60 ± 6.42	0.003

**Table 2.** Characteristics of pituitary adenomas based on Knosp score. APD: anteroposterior diameter; TD: transverse diameter; CCD: craniocaudal diameter.

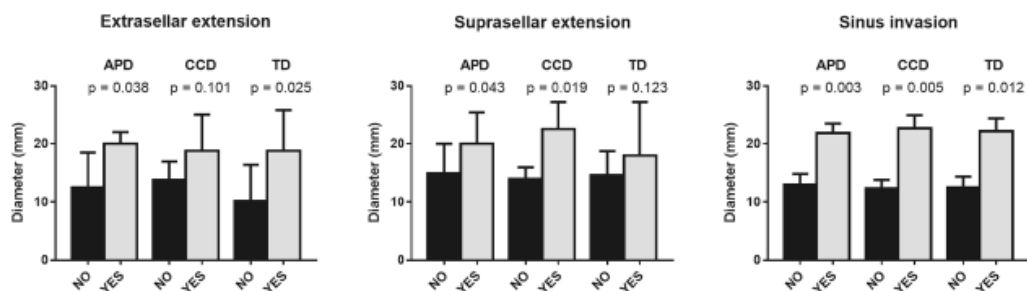
hyperintense on T2-weighted imaging, GH-secreting adenomas can present varying intensities). Yet, the reason for this variability in T2 intensity is unclear<sup>4</sup>.

The behaviour and response to treatment of GH-secreting adenomas depend on their clinical, biochemical, imaging and genetic characteristics, which cannot still be used, routinely and reliably, to predict the aggressiveness of the tumour at the time of diagnosis. Tumour markers such as securin or pituitary tumour-transforming gene (PTTG1)<sup>9</sup> and the Ki67 proliferation marker<sup>10</sup> can be evaluated from the tumour, as well as several receptors of central and hypothalamic hormones such as somatostatin (sst), dopamine (DRD), ghrelin (GHSR1a) or vasopressin (AVPR1b) receptors<sup>11–16</sup>. Specifically, somatostatin receptors 2 (sst2) and 5 (sst5) predominate (90%–95%) in GH-secreting tumours<sup>12,17</sup>, and the expression of these sst subtypes could provide a predictor of response to somatostatin analogue (SSA) therapy<sup>12,13,18</sup>, which would be clinically relevant as a considerable number of patients are or become totally or partially resistant to SSA therapy<sup>19–22</sup>. Interestingly, in an attempt to clarify patient response to SSAs, various studies have shown that large tumours with low sst2 expression are generally: (1) poorly granulated, (2) exhibit low positivity for GH, and (3) more invasive. While densely granulated tumours with increased sst2 expression seem to respond better to SSA<sup>23–27</sup>.

Nevertheless, the molecular analysis of receptors is only possible after surgery, and it is not available in all hospitals. Thus, molecular parameters have not been developed hitherto to predict which patients will respond to treatment, or the progression of the disease. In this context, our main objective was to determine whether the T2-weighted intensity of the adenoma correlates to the clinical and pathological characteristics of the patient at diagnosis of acromegaly and/or the genetic expression of different tumour-related receptors, in order to more precisely classify the tumours and, if required, to predict the most effective medical preoperative treatment (which could be indicated in the case of extensive cavernous sinus invasion, absence of chiasmal compression, or poor surgical candidate<sup>28</sup>).

## Results

**Patients characteristics.** Twenty-two patients were included in the study (41% men; 59% women). Baseline clinical and analytical characteristics of the patients are shown in Supplemental Table 1 and Supplemental Table 2, respectively. Mean age at diagnosis of acromegaly was 42.09 ± 17.15 years (42.56 ± 18.08 in men vs. 41.77 ± 17.22 in women;  $p = 0.919$ ). Clinical manifestations at diagnosis of acromegaly did not differ between men and women, except for headache, which was more frequent in women. Interestingly, the prevalence of obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS) is lower than expected according to the latest review<sup>29</sup>, but similar to some national acromegaly registries<sup>30</sup>. In this sense, it should be mentioned that, in our study, patients were classified as OSAS if the Lung Specialist recommended the use of continuous positive airway pressure (CPAP) (Supplemental Table 1). Circulating Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) levels at diagnosis were 575.45 ± 287.51 ng/ml (605.84 ± 266.64 in men vs. 607.81 ± 280.94 in women;  $p = 0.987$ ), thus presenting no differences between genders (Supplemental Table 2). In addition, although there is no consensus in the current bibliography<sup>31–33</sup>, our data indicate that in this cohort, circulating basal and nadir GH level following oral glucose tolerance test (OGTT) were both significantly higher in men than in women (Supplemental Table 2).



**Figure 1.** Association between extrasellar/suprasellar extension and invasion and the diameter of somatotropinomas. The diameter of GH secreting adenomas was measured in millimetres. APD: anteroposterior diameter; CCD: craniocaudal diameter; TD: transverse diameter. Data represent median  $\pm$  interquartile range in extrasellar/suprasellar extension and mean  $\pm$  SEM in invasion graphs. Differences were evaluated by Student t or Mann-Whitney U tests depending on the normality of each data distribution.

**Magnetic Resonance Imaging (MRI).** Nearly all patients (95%) presented macroadenoma when examined by MRI. Mean anteroposterior, transverse and craniocaudal diameter (APD, TD and CCD, respectively) were  $18.62 \pm 6.78$ ,  $18.97 \pm 8.09$  and  $18.87 \pm 8.28$  mm, respectively. Interestingly, the classification of adenomas by size into 3 groups, less than 10 mm, between 10 and 20 mm, and greater than 20 mm, as previously reported<sup>4</sup> revealed that patients with larger adenomas had numerically higher levels of IGF-1 and basal or nadir GH after OGTT, although these changes were not statistically significant within groups (Table 1).

In total, 79% of patients presented extrasellar tumour extension, wherein 63% exhibited suprasellar growth. As expected, tumours with extrasellar/suprasellar growth and those that invaded the sinuses were larger than the tumours without extension and/or invasion (Fig. 1). No differences in tumour size was found in terms of sex, age at diagnosis, IGF-1 level, and basal or nadir GH after OGTT.

Additionally, right cavernous sinus space invasion was observed in 26% of patients, left sinus invasion in 21%, and invasion of both spaces in 16%. A higher Knosp score was associated with larger tumour diameter (Table 2), but not with any other study parameter, including IGF-1 levels.

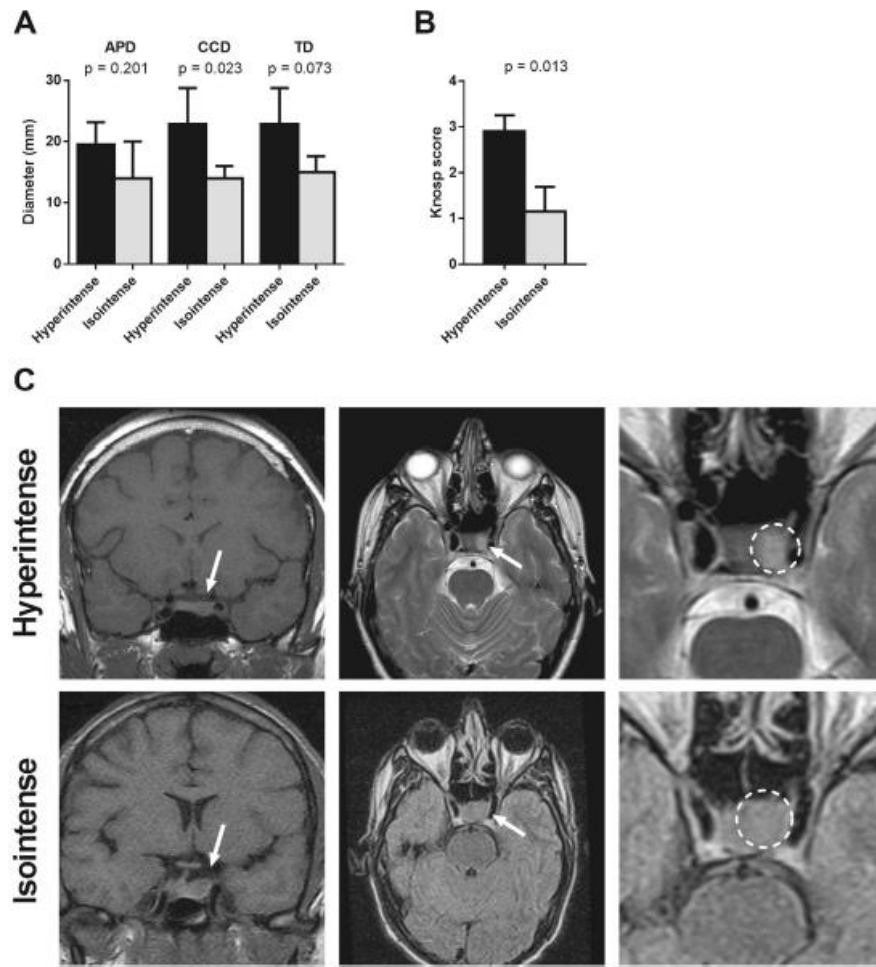
Finally, T2 imaging indicated that 59% of adenomas were hyperintense and 41% isointense. No hypointense adenomas were found in our series. T2 intensity (hyperintense vs. isointense groups) did not differ significantly when compared with sex, age, IGF-1 levels, or nadir GH at diagnosis. On T2-weighted MRI, CCD and TD of hyperintense adenomas were, or tended to be, greater than isointense tumours ( $p = 0.023$  and  $p = 0.073$ , respectively) (Fig. 2A). Moreover, mean Knosp score for hyperintense adenomas was higher than in isointense tumours (Fig. 2B). Representative images of hyperintense and isointense adenomas are shown in Fig. 2C.

All hyperintense adenomas presented extrasellar growth vs. only 43% of isointense adenomas ( $p = 0.023$ ). Furthermore, tumours that presented suprasellar growth or those that invaded the cavernous sinus space were more commonly hyperintense compared to isointense adenomas (in both cases, 90% vs. 42.9%;  $p = 0.036$ ). Specifically, in the case of hyperintense adenomas, 10% were only invasive, 10% were only suprasellar, and 80% were both. However, no statistically significant differences were found between hyperintense and isointense tumours with regard to treatment or disease control, as specified in Methods section (Table 3).

**Molecular analysis of the pituitary adenomas.** The analysis of the molecular profile (Fig. 3A) confirmed that somatotropinomas expressed high levels of GH ( $19.586 \pm 113.743$  copies/adjusted by ACTB) and low levels of other hormones, being PRL ( $0.07 \pm 0.147$  copies/adjusted by ACTB) and POMC ( $0.01 \pm 0.017$  copies/adjusted by ACTB) the most expressed among them.

Somatostatin and dopamine receptor subtypes were differently expressed (Fig. 3B,C). Particularly, sst5 and sst2 were the most frequently expressed (95% of the tumours in both cases), followed by sst3 (74%) and sst1 (59%). In the case of dopamine system, DRD2 was most frequently expressed receptor (100% of the cases), followed by DRD4 (89%), DRD1 (87%) and DRD5 (80.0%). As expected, GH-releasing hormone receptor (GHRHR) and ghrelin receptor (GHSR1a) were also expressed at high levels in these somatotropinomas (100% and 92% of the cases, respectively; Fig. 3D), being GHRH-R mRNA levels significantly higher than those of GHSR1a. In contrast, other receptors subtypes involved in the function of different pituitary cell types, such as gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR), corticotropin-releasing hormone receptor (CRHR1) or vasopressin receptor (AVPR1b) were not noticeably expressed in somatotropinoma samples (Fig. 3D). We also measured two well-known proliferation markers in our cohort of somatotropinoma samples, and found that PTTG1 mRNA levels were higher than Ki67 levels (Fig. 3E).

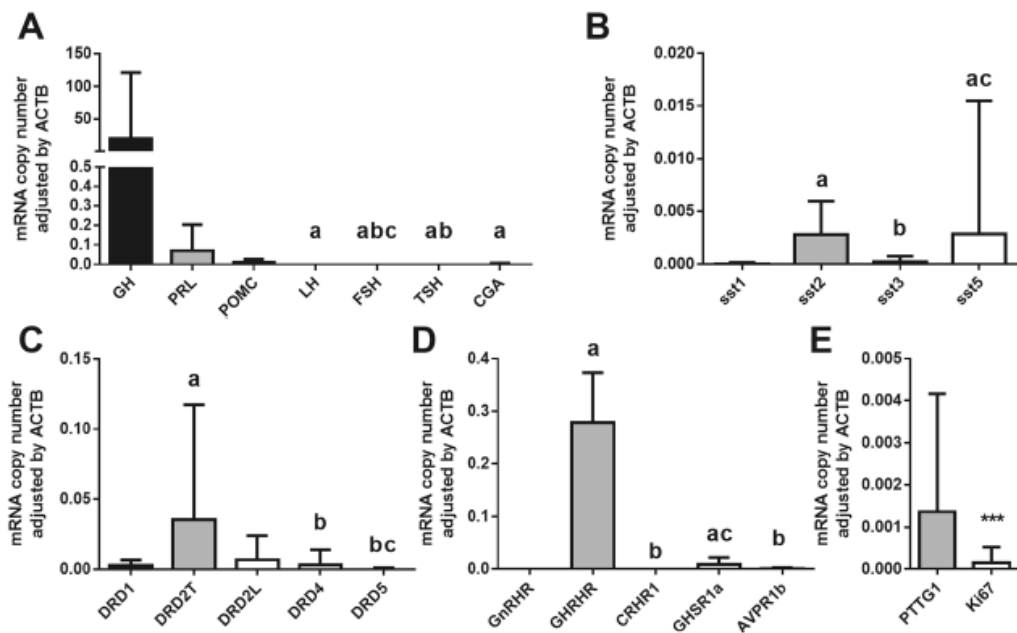
Interestingly, adenomas with extrasellar and suprasellar extension tended to present higher sst3 levels (Fig. 4A,B). In the same line, adenomas with suprasellar extension presented higher levels of DRD4 and DRD5 than adenomas without suprasellar extension (Fig. 4B). No differences were found concerning the invasion of cavernous sinuses. Moreover, compared to isointense adenomas, hyperintense adenomas at T2 imaging presented higher expression levels of DRD5, and a trend for enhanced Ki67 expression (Fig. 4C). Nevertheless, no other receptors or hormones were different in hyperintense vs. isointense adenomas at mRNA level. Additionally, a



**Figure 2.** Association between T2-signal and the diameter (A) and Knosp score (B) of somatotropinomas. The diameter of GH secreting adenomas was measured in millimetres. APD: anteroposterior diameter; TD: transverse diameter; CCD: craniocaudal diameter. Data represent median  $\pm$  interquartile range. (C) Classification of T2-weighted signal of GH secreting pituitary adenomas: T2-hyperintense adenomas, upper-panel and T2-isointense adenomas, lower-panel. Tumour region was indicated with an arrow in coronal MRI (left), and in T2-weighted axial MRI (middle), the tumour area was indicated by a circle in right panel.

Pharmacological Treatment	Number (%)			Radiotherapy			Disease control (%)		
	Total	Iso	Hyper	Total	Iso	Hyper	Total	Iso	Hyper
No treatment	5 (22.7)	1	4	0	0	0	5	1	4
Oct	2 (9.1)	1	1	1	1	0	0	0	0
Lan	5 (22.7)	3	2	3	2	1	2	1	1
Cab	3 (13.6)	2	1	0	0	0	3	2	1
Oct+ Cab	2 (9.1)	0	2	0	0	0	0	0	0
Lan+ Cab	3 (13.6)	1	2	1	1	0	3	1	2
Pas+ Cab	1 (4.5)	1	0	1	1	0	1	1	0
Peg+ Cab	1 (4.5)	0	1	1	0	1	0	0	0
Total	22 (100)	9	13	7	5	2	14 (63.7)	6	8

**Table 3.** Treatment overview of the patients according to T2-intensity. Iso: isointense adenomas; Hyper: hyperintense adenomas; Oct: octreotide; Lan: lanreotide; Cab: cabergoline; Peg: pegvisomant.



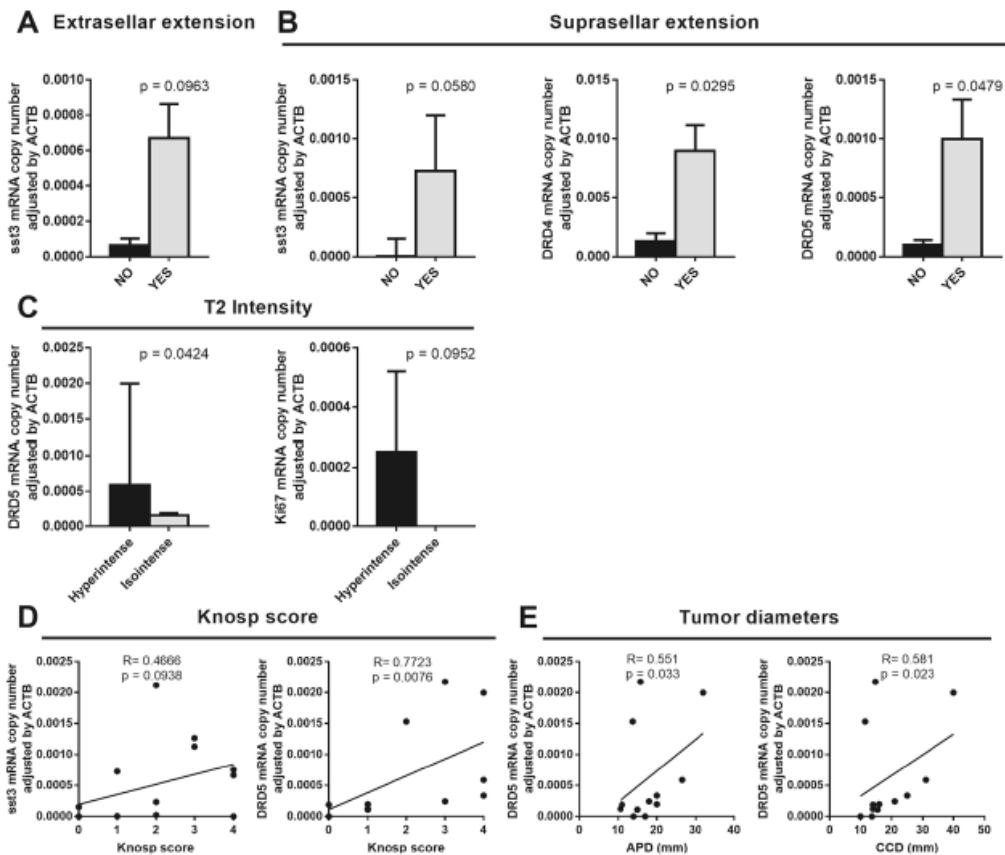
**Figure 3.** Molecular characterisation of the somatotropinomas. Seventeen somatotropinomas were available to determine by quantitative real-time PCR (qPCR) the expression profile of: (A) pituitary hormones [growth hormone (GH), prolactin (PRL), proopiomelanocortin (POMC), luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), thyroid-stimulating hormone (TSH) and the alpha subunit of the glycoproteins (CGA)]; (B) the five somatostatin receptors subtypes (sst1-5); (C) the five dopamine receptors subtypes (DRD1-5), including the total and large isoform of DRD2 (DRD2T and DRD2L, respectively); (D) other receptors [gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR), growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR), corticotropin releasing hormone receptor (CRHR1), ghrelin receptor (GHSR1a), arginine-vasopressin receptor 1b (AVPR1b); and (E) and two proliferation markers [securin (PTTG1) and Ki67]. Data represent median  $\pm$  interquartile range of absolute expression levels (copy number) of each transcript adjusted by the expression levels of a control gene (ACTB). Values in A-D that do not share a common letter are statistically different ( $P < 0.05$ ) using a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparisons test. Mann-Whitney test was used for E (\*\*\*) indicates  $P < 0.001$ ).

direct correlation was also found between expression of DRD5 and the Knosp score, which also showed a trend to associate with the expression of sst3 (Fig. 4D). Finally, DRD5 expression was directly correlated with both APD and CCD (Fig. 4E).

### Discussion

The main objective of this study was to determine whether the T2-weighted intensity of the adenoma correlates to the patient's clinical and pathological characteristics at diagnosis of acromegaly, or to the genetic expression of different tumour-relevant receptors and tumour-related markers. To that end, we retrospectively analysed a series of 22 patients bearing a GH-producing tumour, in whom T2-weighted intensity analysis of the adenoma were available. Interestingly, we found a predominance of hyperintense adenomas in our series (59%), and no evidence of hypointense tumours, even though these latter have been previously reported to account for between 27% and 50% of all adenomas<sup>4-8</sup>. This discrepancy is probably related to differences in the definition of adenoma intensity on T2-weighted MRI among published studies. Our approach to intensity definition is similar to that used by Potorac *et al.*, who compared T2-weighted signal intensity of adenomas with that of normal pituitary tissue, and on this basis classified them as hypo-, iso-, or hyper-intense<sup>4</sup>. When normal tissue was concealed, signal intensity was compared with that of temporal lobe grey matter. In other studies, signal intensity of adenomas on T2-weighted MRI was classified as hyperintense when higher than grey matter intensity, hypointense when lower than white matter intensity, and isointense when higher than white matter intensity but lower than grey matter intensity<sup>5,6,8,34,35</sup>. However, it seems reasonable to conceive that studies involving MRI evaluation of pituitary tumours should compare T2-weighted signal intensity of adenoma tissue with that of normal pituitary tissue whenever possible, as we have performed in this study.

In our series, hyperintense adenomas tended to be larger than isointense tumours, especially if APD is considered, and more invasive, presenting a higher Knosp score. In fact, all hyperintense adenomas presented extrasellar growth, wherein 90% of them were suprasellar. Invasion of the cavernous sinus space was also more common in hyperintense vs. isointense adenomas. These findings are consistent with those of other published



**Figure 4.** Association between molecular markers and tumour phenotype. (A and B) Association between the presence of extracellular and suprasellar extension and mRNA levels of sst3, DRD4 and DRD5. (C) Association between T2 signal and mRNA levels of DRD5 and Ki67. (D and E) Correlation study between Knosp score and tumour diameter and mRNA level of sst3 and DRD5.

reports<sup>4,6,8</sup>, and suggest that adenomas that are hyperintense on T2-weighted MRI are potentially more proliferative than non-hyperintense tumours. Additionally, Heck *et al.*, reported that adenomas that are hyperintense on T2-weighted MRI tend to be larger but secrete less GH and hence are associated with lower IGF-1 levels, which could be explained by the finding that all sparsely granulated adenomas studied were hyperintense, while the densely granulated ones were mainly hypo or isointense<sup>6,8</sup>. In this sense, it has been reported that sparsely granulated somatotropinomas are typically larger, more invasive, less responsive to treatment and more frequently found in younger patients, compared to densely granulated tumours<sup>36</sup>, which indicates that hyperintense adenomas (which usually correspond to sparsely granulated adenomas) may be more aggressive. Additionally, it has also been reported that hyperintense adenomas differed significantly in GH and IGF-1 levels from the hypo- and isointense group<sup>37</sup>, wherein the absolute IGF-1 values tended to be lower in the hyperintense group despite a trend towards younger age. Moreover, as tumour size tended to be larger in the hyperintense group, the amount of GH secreted respective to the tumour volume, also known as *GH-index*, was higher in the hyperintense adenomas and, furthermore, the response to an octreotide test was blunted in these patients<sup>37</sup>. Remarkably, a similar phenotype has been reported in sparsely-granulated adenomas, wherein a trend towards lower *GH-index* and blunted response to octreotide test dose has been described<sup>27,38</sup>. Therefore, these data indicate that the hypo and hyperintense tumours might represent biologically different subgroups with a divergent secretory behaviour. Further supporting this idea, recent guidelines for acromegaly management have also noted the potential utility of using T2 intensity to optimize patient management<sup>28</sup>.

Few studies have explored to date the potential association between MRI features of pituitary adenomas and their molecular profile. In our series of somatotropinomas, the overall pattern of gene expression appeared to be in line with that reported in comparable previous studies. Thus, specifically, GH was the most abundantly expressed hormone, followed by PRL and POMC<sup>17</sup>. Similarly, sst5 and sst2, and DRD2 were the mainly expressed somatostatin and dopamine receptors in tumoural somatotropes<sup>12,16,17,39,40</sup>. As previously reported, the most

expressed receptors for hypothalamic regulators were those for GHRH<sup>41</sup> and ghrelin<sup>14,42–46</sup>, while the expression of receptors for other hypothalamic modulators such as GnRH, AVPR1b and CRHR1 are virtually lacking, as previously observed<sup>47</sup>. A recent study has evaluated the relation between T2 intensity and sst2 and sst5 immunoreactivity, and, interestingly, the level of sst5, but not sst2, was inversely correlated with T2 intensity<sup>35</sup>. In our series, no apparent associations were found between sst2 or sst5 expression and T2 intensity. However, the molecular study revealed, for the first time, that although the expression of sst3, DRD4 and DRD5 is low in these samples, it is increased in adenomas with suprasellar extension compared with the tumours with no suprasellar growth. Of note, these receptors are not currently targeted with specific pharmacological therapies for pituitary adenomas, as there are no available selective agonists for these receptors. Our present results suggest that this possibility is worth to be explored, due to its putative therapeutic implications, and, therefore, further studies should be implemented in this regard. Moreover, we found that T2 hyperintense tumours presented an increased expression of DRD5 and Ki67 at mRNA level, together with the larger size and invasive nature, lending credence to the notion that DRD5 might be a marker of poor prognosis. In support to this contention is the direct correlation between DRD5 and APD and CCD diameter, which is also further reinforced by the direct association between Knosp score and DRD5 and sst3 expression. These findings, which are reported for the first time in the literature, suggest that a combined analysis of T2 intensity and expression of these molecular markers could help to guide therapeutic choices at the time of diagnosis. Indeed, our results could suggest that larger tumours, characterised by poorer prognosis for surgical resolution and bearing a higher expression of DRD5 and sst3, could be possibly treated before surgery using alternative DRD agonists (i.e. with high affinity for DRD5) or pasireotide (a multireceptor ligand with affinity for sst1, sst2, sst3 and sst5), insofar the mRNA of these receptors is correctly transcribed to protein, as previously reported in neuroendocrine tumours<sup>48</sup>.

In conclusion, in this study we found that on T2-weighted imaging, hyperintense GH-secreting pituitary adenomas are larger and tend to be more aggressive due to the invasion of adjacent structures, and these features may be linked to the expression of specific molecular markers. Hence, detailed preoperative imaging studies might help to predict the ideal preoperative treatment and management in these patients. However, further studies in larger cohorts of patients using the same criteria for defining pituitary adenoma characteristics on MRI, collecting the pharmacological and/or radiotherapy treatment outcome and analysing the molecular profile are required to clarify the implications of MRI in somatotropinoma characterization and in the choice of medical treatment, if required.

## Methods

**Patients.** This is a retrospective, single-centre study (Reina Sofia University Hospital in Cordoba, Spain) including all patients diagnosed with acromegaly that had a preliminary MRI of the pituitary prior to the start of treatment, and with a molecular expression profile of the tumour immediately after surgery. Only patients with a confirmed diagnosis of acromegaly were included. This study was approved by the Hospital Ethic Committee and conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients.

Diagnosis of acromegaly was based on the presence of classic clinical features and on a result of GH  $\geq 1$  ng/dl in a 75 mg OGTT, elevated IGF-1 levels according to the patient's reference range for age and sex and/or on the presence of a pituitary adenoma by MRI. In all cases, histopathology of the surgical specimen confirmed the presence of a GH-producing adenoma. Criteria to consider successful resolution of acromegaly (cured patients) are disappearance of the pituitary adenoma, normalisation of GH and IGF-1 levels, and suppression of GH levels following OGTT (below 1 or 0.4 ng/l), without the need for medical treatment. Additionally, acromegaly controlled with medication was defined as GH and IGF-1 levels within normal ranges in a patient under treatment<sup>49</sup>. Demographic variables such as age, sex and race were collected, together with clinical characteristics and results of different tests at diagnosis. Exclusion criteria were pregnancy or breastfeeding and refusal to sign the informed consent form.

**Magnetic Resonance Imaging.** Imaging studies were performed using high resolution 1.5 T MRI instrument (MAGNETOM Aera 1.5 Tesla, Siemens). To qualify for inclusion in the study, patients must have at least 1 coronal and 1 sagittal T1- and T2-weighted sequence. MRI images were independently analyzed by two neuro-radiologists expert in the interpretation of MRI pituitary images, wherein their evaluations were 100% concurrent. The following parameters were recorded: anteroposterior diameter (APD), transverse diameter (TD) and craniocaudal diameter (CCD), extrasellar growth, presence or absence of suprasellar contact with optic chiasm, invasion of cavernous sinus space, and T1 and T2 signal intensity. T2-weighted intensity was classified as hypo-, iso- or hyper-intense compared with normal pituitary tissue ( $n = 17/22$  cases). When the pituitary tissue was hidden, as in the case of pituitary macroadenomas, the intensity was compared with that of temporal lobe grey matter ( $n = 5/22$  cases), as previously reported<sup>4</sup>. Invasion of cavernous sinus spaces was classified according to the system of grading invasion of cavernous sinus by pituitary adenomas (grade 0–4) developed by Knosp *et al.*<sup>50</sup>

**Hormonal analysis.** Absolute IGF-1 levels at diagnosis were determined by an immunoradiometric assay (#A15729 Immunotech SAS, Marseille, France) and compared to the upper limit of normal adjusted by age and sex. To avoid ambiguity, IGF-1 levels are expressed as a standard deviation score with respect to the reference range for age, sex, pubertal stage, and determination method. GH was determined by chemiluminescence by immunoradiometric assay (#HGH-RIACT, Cisbio Bioassays, Codolet, France). All the information regarding specificity, detectability, and reproducibility for each of the assays can be accessed at the website of the companies.

**Specimen analysis.** GH-secreting pituitary adenomas tissue samples were obtained during transsphenoidal surgery. The fact that the tissue piece collected by our laboratory corresponded to somatotropinoma tissue was confirmed by 3 separate methods, as previously reported<sup>15</sup>; by the examination of an anatomopathologist expert

in pituitary, by testing of the hormonal phenotype using cell-blotting assays, and by assessing the molecular screening using qPCR evaluating the genes described above, which has been repeatedly proven in our laboratory<sup>11</sup>. Subsequently, a portion of the tumour was retained for pathological examination and the remaining fragments were snap frozen in liquid nitrogen until RNA extraction. Total RNA was isolated with the AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit with deoxyribonuclease treatment using RNase-Free DNase Set (Qiagen, Limburg, Netherlands), following the instructions of the manufacturer. In all cases, total RNA concentration and purity was assessed using Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Total RNA was retro-transcribed using random hexamer primers and the cDNA First Strand Synthesis kit (Thermo Scientific). Details regarding the quantitative PCR (qPCR) procedure used to determine the absolute expression levels of the different transcripts included in this study have been previously reported by our laboratory<sup>11–15</sup>. Specifically, the genes analysed in this study were: growth hormone (GH), prolactin (PRL), proopiomelanocortin (POMC), follicle stimulating hormone (FSH), luteinising hormone (LH), thyroid-stimulating hormone (TSH) and the alpha subunit of the glycoproteins (CGA); somatostatin receptor subtypes (sst1, sst2, sst3, sst5), dopamine receptor subtypes (DRD1, DRD2, DRD2L, DRD4, DRD5), other hormonal receptors [gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR), growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR), corticotropin releasing hormone receptor (CRHR1), ghrelin receptor (GHSR1a) and arginine-vasopressin receptor 1b (AVPR1b)] and two proliferation markers (Ki67 and PTTG1). Specific sets of primers for these genes have been previously validated and reported by our group<sup>11</sup>. To control for variations in the amount of RNA used in the retro-transcription reaction and the efficiency of the retro-transcription reaction, mRNA copy numbers of the different transcripts analysed were adjusted by beta-actin (ACTB) expression (used as housekeeping gene, as recently reported<sup>39</sup>).

**Statistical analysis.** The descriptive analysis of qualitative variables in each category was expressed in terms of absolute frequencies and percentage. Quantitative variables are expressed as mean  $\pm$  standard variation, using the Shapiro-Wilk analysis to test for normality. mRNA data adjusted by ACTB expression were expressed as median  $\pm$  interquartile range. Wherever non-normal variables were detected, the corresponding non-parametric test was used. The chi-square test was used to associate qualitative variables. Means were compared using the Student's t test for parametric variables, and the Mann-Whitney U test for non-parametric variables. In the case of multiple comparison, a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparisons test was performed. Spearman's correlation coefficient was used as a measure of correlation between non-parametric variables. Statistical significance was set at 5%, and the statistical analysis was performed using SPSS version 22.0 for Windows, and GraphPad Prism 7.0.

## References

- Puig Domingo, M. Treatment of acromegaly in the era of personalized and predictive medicine. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **83**, 3–14, <https://doi.org/10.1111/cen.12731> (2015).
- Capatina, C. & Wass, J. A. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Acromegaly. *J. Endocrinol.* **226**, T141–160, <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0109> (2015).
- Ben-Shlomo, A. & Melmed, S. Acromegaly. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **37**, 101–122, viii, <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2007.10.002> (2008).
- Potorac, I. et al. Pituitary MRI characteristics in 297 acromegaly patients based on T2-weighted sequences. *Endocr. Relat. Cancer* **22**, 169–177, <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0305> (2015).
- Hagiwara, A. et al. Comparison of growth hormone-producing and non-growth hormone-producing pituitary adenomas: imaging characteristics and pathologic correlation. *Radiology* **228**, 533–538, <https://doi.org/10.1148/radiol.2282020695> (2003).
- Heck, A. et al. Intensity of pituitary adenoma on T2-weighted magnetic resonance imaging predicts the response to octreotide treatment in newly diagnosed acromegaly. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **77**, 72–78, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04286.x> (2012).
- Bakhtiar, Y. et al. Geometric survey on magnetic resonance imaging of growth hormone producing pituitary adenoma. *Pituitary* **17**, 142–149, <https://doi.org/10.1007/s11102-013-0479-z> (2014).
- Heck, A., Emblem, K. E., Casar-Borota, O., Bollerslev, J. & Ringstad, G. Quantitative analyses of T2-weighted MRI as a potential marker for response to somatostatin analogs in newly diagnosed acromegaly. *Endocrine* **52**, 333–343, <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0766-8> (2016).
- Melmed, S. Acromegaly pathogenesis and treatment. *J. Clin. Invest.* **119**, 3189–3202, <https://doi.org/10.1172/JCI39375> (2009).
- Zhao, D., Tomono, Y. & Nose, T. Expression of P27kip1 and Ki-67 in pituitary adenomas: an investigation of marker of adenoma invasiveness. *Acta Neurochir. (Wien.)* **141**, 187–192 (1999).
- Luque, R. M. et al. The Molecular Registry of Pituitary Adenomas (REMAH): A bet of Spanish Endocrinology for the future of individualized medicine and translational research. *Endocrinol Nutr* **63**, 274–284, <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.03.001> (2016).
- Taboada, G. F. et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur. J. Endocrinol.* **156**, 65–74, <https://doi.org/10.1530/eje.1.02313> (2007).
- Taboada, G. F. et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to *in vivo* hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *Eur. J. Endocrinol.* **158**, 295–303, <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0562> (2008).
- Ibáñez-Costa, A. et al. In1-ghrelin splicing variant is overexpressed in pituitary adenomas and increases their aggressive features. *Sci. Rep.* **5**, 8714, <https://doi.org/10.1038/srep08714> (2015).
- Luque, R. M. et al. A cellular and molecular basis for the selective desmopressin-induced ACTH release in Cushing disease patients: key role of AVPR1b receptor and potential therapeutic implications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 4160–4169, <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1992> (2013).
- Neto, L. V. et al. Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 1931–1937, <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1826> (2009).
- Ibáñez-Costa, A. et al. Octreotide and pasireotide (dis)similarly inhibit pituitary tumor cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* **231**, 135–145, <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0332> (2016).
- Casarini, A. P. et al. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary* **12**, 297–303, <https://doi.org/10.1007/s11102-009-0175-1> (2009).



19. Colao, A., Auriemma, R. S., Lombardi, G. & Pivonello, R. Resistance to somatostatin analogs in acromegaly. *Endocr. Rev.* **32**, 247–271, <https://doi.org/10.1210/er.2010-0002> (2011).
20. Theodoropoulou, M. & Stalla, G. K. Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front. Neuroendocrinol.* **34**, 228–252, <https://doi.org/10.1016/j.ynrne.2013.07.005> (2013).
21. Cuevas-Ramos, D. & Fleseriu, M. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *J. Mol. Endocrinol.* **52**, R223–240, <https://doi.org/10.1530/JME-14-0011> (2014).
22. Brzana, J., Yedinak, C. G., Gültekin, S. H., Delashaw, J. B. & Fleseriu, M. Growth hormone granulation pattern and somatostatin receptor subtype 2A correlate with postoperative somatostatin receptor ligand response in acromegaly: a large single center experience. *Pituitary* **16**, 490–498, <https://doi.org/10.1007/s11102-012-0445-1> (2013).
23. Kiseljak-Vassiliades, K. et al. Clinical implications of growth hormone-secreting tumor subtypes. *Endocrine* **42**, 18–28, <https://doi.org/10.1007/s12020-012-9660-9> (2012).
24. Horvath, E. & Kovacs, K. Pathology of acromegaly. *Neuroendocrinology* **83**, 161–165, <https://doi.org/10.1159/000095524> (2006).
25. Larkin, S. et al. Granulation pattern, but not GSP or GHR mutation, is associated with clinical characteristics in somatostatin-naïve patients with somatotroph adenomas. *Eur. J. Endocrinol.* **168**, 491–499, <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0864> (2013).
26. Mayr, B. et al. Molecular and functional properties of densely and sparsely granulated GH-producing pituitary adenomas. *Eur. J. Endocrinol.* **169**, 391–400, <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0134> (2013).
27. Fougner, S. L., Casar-Borota, O., Heck, A., Berg, J. P. & Bollerslev, J. Adenoma granulation pattern correlates with clinical variables and effect of somatostatin analogue treatment in a large series of patients with acromegaly. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **76**, 96–102, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04163.x> (2012).
28. Katznelson, L. et al. Acromegaly: an endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 3933–3951, <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2700> (2014).
29. Pivonello, R. et al. Complications of acromegaly: cardiovascular, respiratory and metabolic comorbidities. *Pituitary* **20**, 46–62, <https://doi.org/10.1007/s11102-017-0797-7> (2017).
30. Maione, L. et al. Changes in the management and comorbidities of acromegaly over three decades: the French Acromegaly Registry. *Eur. J. Endocrinol.* **176**, 645–655, <https://doi.org/10.1530/EJE-16-1064> (2017).
31. Sze, L. et al. Gender dependence of serum soluble Klotho in acromegaly. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **80**, 869–873, <https://doi.org/10.1111/cen.12385> (2014).
32. Eden Engstrom, B., Burman, P. & Karlsson, F. A. Men with acromegaly need higher doses of octreotide than women. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **56**, 73–77 (2002).
33. Tanaka, S., Fukuda, I., Hizuka, N. & Takano, K. Gender differences in serum GH and IGF-I levels and the GH response to dynamic tests in patients with acromegaly. *Endocr. J.* **57**, 477–483 (2010).
34. Puig-Domingo, M. et al. Magnetic resonance imaging as a predictor of response to somatostatin analogs in acromegaly after surgical failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 4973–4978, <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0573> (2010).
35. Shen, M. et al. Predictive value of T2 relative signal intensity for response to somatostatin analogs in newly diagnosed acromegaly. *Neuroradiology* **58**, 1057–1065, <https://doi.org/10.1007/s00234-016-1728-4> (2016).
36. Ibáñez-Costa, A. & Korbonits, M. AIP and the somatostatin system in pituitary tumours. *J. Endocrinol.*, <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0254> (2017).
37. Potorac, I. et al. T2-weighted MRI signal predicts hormone and tumor responses to somatostatin analogs in acromegaly. *Endocr. Relat. Cancer* **23**, 871–881, <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0356> (2016).
38. Obari, A. et al. Clinicopathological features of growth hormone-producing pituitary adenomas: difference among various types defined by cytokeratin distribution pattern including a transitional form. *Endocr. Pathol.* **19**, 82–91, <https://doi.org/10.1007/s12022-008-9029-z> (2008).
39. Ibáñez-Costa, A. et al. BIM-23A760 influences key functional endpoints in pituitary adenomas and normal pituitaries: molecular mechanisms underlying the differential response in adenomas. *Sci. Rep.* **7**, 42002, <https://doi.org/10.1038/srep42002> (2017).
40. Gatto, F. et al. beta-Arrestin 1 and 2 and G protein-coupled receptor kinase 2 expression in pituitary adenomas: role in the regulation of response to somatostatin analogue treatment in patients with acromegaly. *Endocrinology* **154**, 4715–4725, <https://doi.org/10.1210/en.2013-1672> (2013).
41. Garcia, E. A. et al. Characterization of SNARE proteins in human pituitary adenomas: targeted secretion inhibitors as a new strategy for the treatment of acromegaly? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E1918–E1926, <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2602> (2013).
42. Gahete, M. D. et al. Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight. *J. Endocrinol.* **220**, R1–R24, <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0391> (2014).
43. Barlier, A. et al. Expression of functional growth hormone secretagogue receptors in human pituitary adenomas: polymerase chain reaction, triple *in-situ* hybridization and cell culture studies. *J. Neuroendocrinol.* **11**, 491–502 (1999).
44. Korbonits, M. et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 881–887 (2001).
45. Rubinfeld, H. et al. Novel ghrelin analogs with improved affinity for the GH secretagogue receptor stimulate GH and prolactin release from human pituitary cells. *Eur. J. Endocrinol.* **151**, 787–795 (2004).
46. Korbonits, M. et al. Expression of the growth hormone secretagogue receptor in pituitary adenomas and other neuroendocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 3624–3630 (1998).
47. Sanchez-Tejada, L. et al. Contribution of molecular analysis to the typification of the non-functioning pituitary adenomas. *PLoS One* **12**, e0180039, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180039> (2017).
48. Kaemmerer, D. et al. Somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms: new diagnostic, prognostic, and therapeutic markers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 831–840, <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2699> (2015).
49. Cordido, F., Garcia Arnes, J. A., Marazuela Aspiroz, M. & Torres Vela, E. & grupo de Neuroendocrinología de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición. [Practical guidelines for diagnosis and treatment of acromegaly. Grupo de Neuroendocrinología de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición]. *Endocrinol Nutr* **60**, 457 e451–457 e415, <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.01.012> (2013).
50. Knosp, E., Steiner, E., Kitz, K. & Matula, C. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery* **33**, 610–617; discussion 617–618 (1993).

## Acknowledgements

This work has been funded by the following grants: Junta de Andalucía (CTS-1406, BIO-0139); Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España (BFU2013-43282, BFU2016-80360-R), Instituto de Salud Carlos III, co-funded by European Union (ERDF/ESE, “Investing in your future”; P116/00264, CP15/00156), Ayuda Merck Serono 2013 and CIBERobn. CIBER is an initiative of Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Spain. Part of the analyses included in this study was carried out within the REMAH (“Spanish molecular registry of pituitary adenomas”) project, supported by Novartis Oncology as well as by the Andalusian and Spanish Societies of Endocrinology and Nutrition (SAEDYN and SEEN).

### Author Contributions

Conception of the work: M.R.A.-E., J.P.C., M.A.G., R.M.L.; Design of research: M.R.A.-E., A.I.-C., J.P.C., M.A.G., R.M.L.; Performed experiments: M.R.A.-E., A.I.-C., P.M.-M., E.R.-C., M.C.V.-B.; Data analysis: M.R.A.-E., A.I.-C., P.M.-M., E.R.-C., M.C.V.-B., R.M.L.; Interpreted results of experiments: M.R.A.-E., A.I.-C., M.D.G., J.P.C., M.A.G., R.M.L.; Prepared figures: M.R.A.-E., A.I.-C., M.D.G., R.M.L.; Acquisition of clinical data and samples: M.R.A.-E., P.M.-M., C.B.-A., A.T.-D.; Acquisition of radiological data: M.S.L.-G., J.A.V.-C.; Draft the work: M.R.A.-E., A.I.-C., M.D.G., J.P.C., M.A.G., R.M.L.; Wrote the manuscript: M.R.A.-E., A.I.-C., M.D.G., J.P.C., M.A.G., R.M.L.; Critically revised the manuscript for important intellectual content and approved final version of manuscript, M.R.A.-E., A.I.-C., P.M.-M., E.R.-C., M.C.V.-B., C.B.-A., A.T.-D., M.S.L.-G., J.A.V.-C., M.D.G., J.P.C., M.A.G., R.M.L.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24260-y>.

**Competing Interests:** M.A. Gálvez, J.P. Castaño and R.M. Luque have received lecture fees and/or research grant support from Ipsen and Novartis. The rest of the authors have nothing to disclose. Novartis Oncology was not involved in the conceptualization, design, data collection, analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript but the financial support of the REMAH database. Additionally, we declare no non-financial involvement of any Novartis Oncology, or any company, employee concerning the publication or preparation of the present manuscript.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

**María Rosa Alhambra Expósito**

Tesis doctoral

2021