



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA TRASLACIONAL

Proyecto Fin de Máster 2012-2013

Enfermedad de Cushing: correlación clínica y molecular

VºBº Tutor proyecto
Justo P. Castaño

VºBº Director proyecto
Raúl M. Luque

VºBº Co-Director proyecto
Manuel D. Gahete

Paloma Moreno Moreno

DPTO. BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

ÍNDICE

1. Resumen.	3
2. Introducción.	5
3. Material y métodos.	12
3.1. Diseño del estudio	12
3.2. Pacientes.	12
3.3. Muestras de adenomas corticotropos.	13
3.4. Extracción de ARN total y retrotranscripción en las muestras.	14
3.5. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qrt-PCR).	14
3.6. Análisis estadístico.	15
4. Resultados.	16
4.1. Características basales.	16
4.2. Estudio molecular del tumor corticotropo.	19
4.3. Resultados post-cirugía transesfenoidal.	21
4.4. Correlación entre los datos clínicos y expresión molecular.	23
5. Discusión.	25
6. Conclusiones.	28
7. Bibliografía.	29

1. RESUMEN.

La enfermedad de Cushing es la causa más frecuente de síndrome de Cushing endógeno. Se asocia a una morbilidad severa, y en pacientes no tratados o no controlados, se asocia a un aumento de la mortalidad. En general, la duración del hipercortisolismo en la enfermedad de Cushing parece estar inversamente relacionada con la reversibilidad de las complicaciones, que a su vez pueden aumentar la mortalidad. Este hecho, hace que sea de suma importancia la identificación de una terapia médica eficaz para normalizar la hiperproducción de cortisol antes de la cirugía transesfenoidal, tratamiento de elección en la enfermedad de Cushing.

El tratamiento más usado y aceptado en pacientes con enfermedad de Cushing antes de la cirugía es el ketoconazol, inhibidor de enzimas androgénicas que reduce la producción de cortisol a nivel suprarrenal. Análogos de la somatostatina y agonistas dopaminérgicos han sido recientemente sugeridos como posibles terapias previas a la cirugía en pacientes con enfermedad de Cushing, o en pacientes intervenidos que presenten recurrencia de la enfermedad. La combinación de ketoconazol con estos fármacos puede ser más eficaz en la reducción de los niveles del hipercortisolismo prequirúrgico. Además, la utilización de análogos de la somatostatina y agonistas dopaminérgicos puede ser útil en pacientes en los que el ketoconazol no pueda ser utilizado.

Tras el tratamiento quirúrgico, el seguimiento de los pacientes con enfermedad de Cushing debe ser de por vida, para evaluar persistencia, remisión o recurrencia de la enfermedad a largo plazo, pues 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 curación de la enfermedad de Cushing en los pacientes tratados con cirugía.

El objetivo principal del presente estudio fue determinar si los datos clínicos de los pacientes con enfermedad de Cushing antes de la cirugía permiten predecir la presencia y/o abundancia de receptores de somatostatina y dopamina a nivel del adenoma corticotropo, para así poder iniciar un tratamiento médico prequirúrgico más eficaz y personalizado para conseguir la reducción de los niveles de cortisol en el menor tiempo posible. Como objetivo secundario se planteó determinar si el estudio de los receptores de somatostatina y dopamina presentes en los tumores hipofisarios corticotropos pueden predecir la remisión o recurrencia de la enfermedad de Cushing en pacientes tratados quirúrgicamente. Los estudios realizados demuestran que existe una correlación positiva entre el tamaño del tumor corticotropo y la

expresión de SSTR-2, SSTR-3, DR-2T, DR-4 y DR-5, hecho que sugiere que en pacientes con enfermedad de Cushing que presenten un tamaño tumoral considerable en las pruebas de imagen, principalmente macroadenomas, podría considerarse iniciar tratamiento prequirúrgico con análogos de la somatostatina y agonistas dopaminérgicos, combinados con ketoconazol o en monoterapia. Sin embargo, el estudio de receptores de somatostatina y dopamina del adenoma corticotropo no permite seleccionar, a priori, a pacientes con mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad de Cushing.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Cushing (EC) se caracteriza por un estado de hipercortisolismo causado por un adenoma hipofisario secretor de corticotropina (ACTH) que se presenta en el 95% de los casos como un microadenoma¹. Es la causa más frecuente de síndrome de Cushing (SC) endógeno ACTH-dependiente, representando el 80% de los casos¹. El adenoma hipofisario secretor de ACTH representa el 14% de los adenomas hipofisarios intervenidos¹. La incidencia de la EC es de 0,7-2,4 casos por millón de habitantes al año²⁻⁴ y su diagnóstico es más frecuente durante la tercera y cuarta décadas de la vida, siendo hasta ocho veces más frecuente en el sexo femenino⁵.

La EC comprende síntomas y signos asociados a una exposición prolongada de niveles inapropiadamente elevados de glucocorticoides. La clínica es común en el SC de cualquier origen (Tabla 1), caracterizada por síndrome metabólico [obesidad central, diabetes mellitus (DM), hipertensión arterial (HTA) y dislipemia], hirsutismo, fragilidad capilar, debilidad muscular, labilidad emocional incluyendo la depresión, alteraciones menstruales y fenotipo clásico con plétora facial, cara de luna llena, lipomatosis cervical, estrías rojizas abdominales y hematomas⁶.

La morbimortalidad de pacientes con EC no tratados, o con enfermedad no controlada es alta. Los pacientes con EC activa presentan una tasa de mortalidad estandarizada cinco veces superior a la normal, disminuyendo hacia la normalidad al alcanzar el estado de eucortisolismo³. Las causas más frecuentes de muerte en estos pacientes son las enfermedades vasculares (infarto agudo de miocardio y enfermedad cerebrovascular) y las infecciones⁷.

SIGNOS	SÍNTOMAS
Distribución grasa: <ul style="list-style-type: none">- Plétora facial.- Atrofia cutánea.- Cara de luna llena.- Lipomatosis cervical.- Obesidad central.	Disminución de libido. Alteraciones menstruales. Fatiga y debilidad. Desconcentración. Pérdida de memoria.
Disfunción proteica:	Apetito. Insomnio.

<ul style="list-style-type: none"> - Osteopenia/Osteoporosis. - Fragilidad capilar. - Inmunodeficiencia. - Edemas miembros inferiores. - Púrpura. - Atrofia cutánea. - Estría rojizas. <p>Síndrome metabólico:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hipertensión arterial. - Diabetes Mellitus. - Dislipemia. - Hipercoagulabilidad. 	<p>Labilidad emocional.</p> <p>Alteraciones neuro-psíquicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Depresión. - Psicosis.
---	--

Tabla 1. Signos y síntomas de la enfermedad de Cushing.

Con respecto a la mortalidad en los pacientes con EC en remisión bioquímica existen datos contradictorios. Algunos estudios muestran esperanza de vida similar a la población general⁸⁻⁹, mientras que otros estudios informan de un aumento en la mortalidad estandarizada¹⁰⁻¹¹. La morbilidad en pacientes con EC tratada es sólo parcialmente reversible¹². Los factores de riesgo cardiovascular persisten con una prevalencia notable en pacientes con remisión de la EC: obesidad/sobrepeso en el 40%, HTA en el 60%, DM o intolerancia a la glucosa en el 60% y dislipemia hasta en el 30% de los pacientes¹²⁻¹⁵. La persistencia de síndrome metabólico en pacientes con EC tratados, parece estar relacionado con la duración de la enfermedad antes de la remisión¹⁴. El estado de hipercoagulabilidad no es reversible con la remisión a corto plazo, siendo parcialmente reversible con la remisión a largo plazo¹⁶⁻¹⁷. La densidad mineral ósea tampoco se recupera completamente en todos los pacientes¹⁸. Por último, la psicopatología puede disminuir después de la remisión de forma dependiente del tiempo¹⁹, aunque su prevalencia es mayor después de la remisión a largo plazo. La función cognitiva con frecuencia sigue estando alterada, lo que sugiere efectos irreversibles del hipercortisolismo crónico a nivel cerebral²⁰. A pesar de la remisión de la EC, la calidad de vida de estos pacientes sigue estando afectada, con mayor intensidad en aquellos que presentan hipopituitarismo²¹.

En general, la duración del hipercortisolismo en la EC parece estar inversamente relacionada con la reversibilidad de las complicaciones, que a su vez pueden aumentar la

mortalidad. Esto indica que una vez establecido el diagnóstico de EC, la producción de cortisol se debe normalizar lo antes posible, siendo para ello necesario un tratamiento médico eficaz²². El diagnóstico precoz y el tratamiento del hipercortisolismo crónico son de suma importancia, pues la larga evolución de la enfermedad se asocia con complicaciones de mayor severidad. De hecho, un tratamiento eficaz mejora la esperanza de vida en pacientes con EC²³⁻²⁴. En general, la cirugía se considera el tratamiento de elección en los pacientes diagnosticados de EC²⁵. La cirugía transesfenoidal en pacientes con adenomas hipofisarios presenta excelentes resultados y las complicaciones quirúrgicas son bajas, especialmente en microadenomas²⁶. La remisión postoperatoria en la EC se alcanza en el 70-90% de los pacientes. La remisión en el postoperatorio inmediato varían entre el 55-85%. La recurrencia de EC a largo plazo es del 10-15%, alcanzando el 25% en estudios con mayor tiempo de seguimiento^{1,6,25}. Tras el tratamiento quirúrgico, el seguimiento de los pacientes con EC debe ser de por vida, con objeto de confirmar la remisión del hipercortisolismo, y evaluar la posibilidad de persistencia tras la cirugía, o de recurrencia en los pacientes que entran en remisión.

La evaluación bioquímica en el periodo postquirúrgico inmediato es necesaria para determinar si el enfermo ha alcanzado la remisión de la enfermedad y el tratamiento quirúrgico ha sido exitoso, o por el contrario, es preciso iniciar otros tratamientos. Niveles de cortisol plasmático inferiores a 1,8 µg/dl en el postoperatorio inmediato se asocian con curación a largo plazo²⁷. Sin embargo, estudios posteriores han puesto de manifiesto que en pacientes en los que se cumplió este criterio presentaban recurrencia en el seguimiento a largo plazo. Además, pacientes con cortisol superior a 1,8 µg/dl después de la operación han presentado remisión clínica en el seguimiento a largo plazo. A esto se añade que muchos de los pacientes que presentan recurrencia, habían mostrado ciclicidad antes de la cirugía, lo que hace más difícil la interpretación de los resultados post-quirúrgicos²⁸. No obstante, el valor predictivo positivo de recaída con niveles de cortisol plasmático superiores a 1,8 µg/dl parece consistente²⁹; de hecho, niveles de cortisol plasmático elevados después de la cirugía, sobre todo superiores de 7,2 µg/dl, se asocia con alta probabilidad de recurrencia. Cabe destacar que la utilización de otros tests como el cortisol tras dexametasona (DXT) a dosis bajas, el cortisol en orina de 24 horas (CLU), el cortisol salival nocturno o el test de la desmopresina para definir la remisión o persistencia de EC tras la cirugía presenta mayor especificidad y sensibilidad que cuando se utiliza los niveles de cortisol basal²⁹⁻³⁴.

Además de esto, el tratamiento médico en la EC está indicado en el momento del diagnóstico para así conseguir la normalización de los niveles de cortisol y en pacientes con EC persistente o recurrente que no son candidatos a la reintervención quirúrgica, o en pacientes con adenomas de localización desfavorable como la región paraselar, macroadenomas sin compresión del quiasma óptico, y en pacientes con alto riesgo quirúrgico. En la actualidad, el tratamiento médico de la EC se fundamenta en las bases moleculares de esta enfermedad. Existen varias opciones terapéuticas como análogos de la somatostatina, agonistas de dopamina, inhibidores de enzimas androgénicas y antagonistas de los receptores de glucocorticoides²². Las distintas modalidades terapéuticas se resumen en la tabla 2.

Lugar de acción	Grupo terapéutico	Acción
Adenohipófisis	<ul style="list-style-type: none"> • Análogos de somatostatina. • Agonistas dopaminérgicos. • Ácido retinoico, ciproheptadina, valproato sódico. 	Descenso de ACTH
Suprarrenales	<ul style="list-style-type: none"> • Ketoconazol. • Mitotano. • Metirapona. • Etomidato. 	Descenso de cortisol
Receptores cortisol	<ul style="list-style-type: none"> • Mifepristona 	Antagoniza receptores de glucocorticoides.

Tabla 2. Terapia médica en la enfermedad de Cushing

Las opciones terapéuticas médicas dirigidas a nivel hipofisario son los análogos de la somatostatina (SSA) y agonistas dopaminérgicos (DA), siendo otras opciones menos validadas experimentalmente el ácido retinoico³⁵, antagonistas de la serotonina (ciproheptadina), y agonista gabaérgico (valproato sódico)³⁶.

La somatostatina (SST) es una hormona pleiotrópica, esencialmente de naturaleza inhibitoria³⁷. Entre sus funciones se encuentra el efecto inhibitor que ejerce sobre la

secreción de varias hormonas de la adenohipófisis, entre ellas la ACTH³⁷. Las diferentes acciones de la SST son mediadas por los receptores de somatostatina (SSTRs), localizados en la membrana plasmática de las células diana. Estos receptores son proteínas de 7 dominios transmembrana (DTM) que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas. Existen cinco subtipos de SSTRs codificados por diferentes genes: SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-4 y SSTR-5³⁷. En la adenohipófisis normal se expresan todos los subtipos excepto el SSTR-4³⁷. Se ha observado expresión diferencial de SSTRs en los adenomas hipofisarios dependiendo del tipo de célula del que derivan³⁸⁻³⁹. En concreto, SSTR-2 y SSTR-5 son los subtipos predominantes en la mayoría de los tumores hipofisarios, sin embargo, en los adenomas hipofisarios corticotropos se observa un predominio en la expresión de SSTR-5 y niveles relativamente bajos de SSTR-2⁴⁰. La expresión relativamente baja de SSTR-2 parece deberse a efectos supresores de estado de hipercortisolismo, siendo SSTR-5 menos sensible a este efecto⁴¹. Teniendo en cuenta estas características, SSTR-5 podría ser una diana terapéutica para el tratamiento médico de EC no tratada. Además, tras el control del hipercortisolismo, los niveles de expresión del SSTR-2 podrían aumentar presentándose como una posible diana adicional para el tratamiento. En este sentido, los SSA se presentan como una alternativa terapéutica prometedora y valiosa ya que podrían inhibir la secreción de ACTH, actuando a través de la activación de uno o varios SSTRs. Dentro de los SSA se encuentran, fundamentalmente, octreotida, lanreotida y pasireotida que difieren en su afinidad específica a uno o varios SSTRs. En concreto, octreotida y lanreotida presentan afinidad preferencial por el SSTR-2, no habiendo demostrado acción supresora en la secreción de ACTH ni descenso en los niveles de cortisol en pacientes con EC⁴². En cambio, pasireotida (SOM-230), un SSA de más amplio espectro con afinidad por el SSTR-2 y el SSTR-5, es capaz de suprimir la secreción de ACTH en cultivos primarios de adenomas corticotropos, *in vitro*⁴³. Basándose en el alto nivel de expresión de SSTR-5 en adenomas corticotropos y en el efecto inhibitorio de pasireotida en la secreción de ACTH, varios ensayos clínicos se han llevado a cabo⁴⁴⁻⁴⁷. El tratamiento con pasireotide ha demostrado en los diferentes ensayos clínicos la disminución o normalización de niveles de CLU. Así, pasireotida ha sido aprobado actualmente en Europa para el tratamiento de pacientes con EC con persistencia tras tratamiento quirúrgico o para aquellos en los que la cirugía está contraindicada.

Por su lado, los DA como la bromocriptina y la cabergolina actúan a nivel de los receptores dopaminérgicos (DRs)⁴⁸⁻⁴⁹. Los DRs pertenecen también a la familia de

receptores con 7 DTM acoplados a proteínas G y existen varios subtipos (DR-1, DR-2, DR-3, DR-4 y DR-5)⁴⁸⁻⁴⁹. DR-1 y DR-5 son preferencialmente estimuladores, mientras que DR-2, DR-3 y DR-4 son principalmente inhibitorios⁵⁰. DR-2 y, en menor medida DR-4, son los subtipos que se expresan mayoritariamente en adenohipófisis⁵¹. Los adenomas productores de ACTH expresan predominantemente DR-2⁴⁸. DR-2 presenta dos isoformas, una larga (DR-2L) y otra corta (DR-2S); ambas isoformas tienen la misma capacidad para unir su ligando, pero DR-2L se expresa unas diez veces más que DR-2S y tiene menor capacidad de acoplarse a proteína G⁵². La diferencia más relevante desde el punto de vista terapéutico y fisiopatológico entre ambas isoformas es la respuesta diferencial a la exposición prolongada a agonistas, pues ambas isoformas experimentan una internalización tras exposición a DA, sin embargo, el grado de internalización de DR-2S es mayor que el de DR-2L, siendo este último más resistente a la desensibilización que presentan estos receptores al tratamiento con DA⁵³. La expresión de DRs en los adenomas corticotropos se correlaciona positivamente con los efectos supresores de la DA, disminuyendo los niveles de cortisol en pacientes con EC⁵¹. El tratamiento con bromocriptina a corto plazo inhibe la secreción de ACTH y los niveles de cortisol en el 40% de los pacientes con EC⁵⁴. Cabergolina normaliza los niveles de cortisol en el 25-40% de los pacientes con EC en los que la cirugía no ha sido curativa^{51,55-57}. Por lo tanto, el DR-2 supone una diana terapéutica importante para el tratamiento de la EC, pero, a diferencia de los efectos observados con pasireotida, cabergolina, ha presentado el denominado “efecto escape”, explicado por la desensibilización de los DRs, en un significativo número de pacientes, incluso tras varios años de tratamiento⁵⁶⁻⁵⁷. No obstante, el tratamiento con cabergolina a largo plazo sigue siendo efectivo⁵⁶.

En estudios recientes se ha demostrado la existencia de una coexpresión de SSTR-5 y DR-2 en aproximadamente el 60% de los adenomas hipofisarios, y en el 30% de ellos existía un nivel de SSTR-2 relativamente bajo³⁸. De acuerdo con estos hallazgos, el tratamiento combinado de pasireotida y DA podría ser útil en pacientes con EC. El tratamiento en monoterapia con pasireotida y cabergolina muestran tasas de remisión de hasta el 25-30%, respectivamente. Sin embargo, en pacientes con hipercortisolismo moderado o severo, la remisión bioquímica, por lo general, sólo se consigue con la combinación de varias modalidades terapéuticas²².

Las distintas opciones terapéuticas pueden ser combinadas en la EC por varias razones. En primer lugar, la remisión bioquímica debe lograrse rápidamente para reducir la

morbimortalidad de esta enfermedad, por lo que varios fármacos se pueden combinar para controlar la producción de cortisol lo antes posible. En segundo lugar, la combinación de fármacos permite utilizar dosis menores, y por consiguiente, menos efectos secundarios. En tercer lugar, la combinación de fármacos que actúan sobre distintas dianas terapéuticas, pueden presentar efectos sinérgicos sobre la reducción de la secreción de ACTH por las células tumorales corticotropas, aumentando la eficacia terapéutica⁵⁸. Tras la remisión bioquímica, la dosis de los fármacos se puede reducir, y en los casos en los que se utilicen varias terapias, se podría pasar a monoterapia.

Por desgracia, hasta el momento, ningún parámetro clínico, bioquímico, anatomopatológico, inmunohistoquímico ni molecular a nivel tumoral ha demostrado su utilidad en la práctica clínica, ya que no permiten predecir la efectividad de estos tratamientos y/o la curación de la enfermedad de Cushing. Por esta razón, el **objetivo principal** de este trabajo ha sido estudiar si los datos clínicos que presentan los pacientes con EC al diagnóstico, pueden predecir el perfil (huella) molecular del adenoma corticotropo para así poder iniciar un tratamiento prequirúrgico personalizado y eficaz para reducir los niveles de hipercortisolismo. Como **objetivo secundario**, se plantea estudiar si el perfil molecular de estos tumores predicen la recurrencia o remisión de la EC, permitiendo seleccionar a los pacientes que precisan seguimiento de por vida.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio

Se ha diseñado un estudio retrospectivo realizado mediante revisión de historias clínicas y análisis del perfil molecular de tumores corticotropos. El estudio fue llevado a cabo conforme a la Declaración de Helsinki. Se obtuvo consentimiento informado de cada paciente para incluirlo en el estudio y para la realización del estudio molecular del tumor corticotropo.

3.2. Pacientes

Se incluyeron todos los pacientes diagnosticados de EC en el Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba durante el periodo comprendido entre 2005 y 2012, que habían sido tratados con cirugía transfenoidal, y cuya muestra tumoral había podido ser analizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba.

Para diagnosticar la EC, es preciso iniciar el diagnóstico de SC, y para ello, nos basamos en pruebas de cribado: CLU, cortisol tras 1 mg de DXT y cortisol salival nocturno. En pacientes con pruebas de cribado anormales, fue necesario realizar pruebas de confirmación: supresión con 2 mg de DXT durante dos días, cortisol plasmático nocturno a las 24h y cortisol salival nocturno. Tras el diagnóstico bioquímico de hipercortisolismo, es necesario identificar su origen ACTH-dependiente o independiente mediante determinación de ACTH plasmática. Si el nivel es mayor de 20 pg/dl estaríamos ante un SC ACTH-dependiente, si es menor de 10 pg/dl sería ACTH-independiente, y si el valor está entre 10 y 20 pg/dl es necesario realizar determinación de ACTH tras estimulación con CRH. En el SC ACTH-dependiente, es necesario realizar diagnóstico diferencial entre EC y SC ectópico, siendo útil para ello la realización de supresión con altas dosis de DXT (2 mg durante dos días o 8 mg a las 24h) o estimulación con CRH⁵⁹. La resonancia magnética (RM) hipofisaria con administración de contraste está indicada en los pacientes con SC ACTH-dependiente. Sin embargo, hasta en un 40% de los casos de EC los resultados de la RM hipofisaria pueden ser negativos⁶⁰. De los adenomas hipofisarios detectados en RM hipofisaria, el 85-87% son microadenomas (diámetro tumoral menor de 10 mm) y el 13-15% restante son macroadenomas (diámetro tumoral mayor de 10 mm)⁶⁰. El cateterismo de senos petrosos es la técnica con mayor precisión para establecer diagnóstico diferencial

entre EC y SC ectópico. En la EC se objetiva un incremento de ACTH en senos petrosos en relación con su concentración a nivel periférico⁶¹. La realización de cateterismo de senos petrosos está indicada en pacientes con alta sospecha de EC y RM hipofisaria negativa, o en pacientes con imagen de adenoma menor de 6 mm en RM hipofisaria⁵⁹. El cateterismo de senos petrosos presenta una sensibilidad y especificidad del 92-100% para el diagnóstico de microadenomas productores de ACTH⁶²⁻⁶³, y predice la lateralidad del microadenoma en el 60-84% de los casos si en un seno petroso demuestra un nivel de ACTH 1,4 veces mayor con respecto al seno petroso contralateral⁶⁴.

Teniendo esto en cuenta, se recogieron los datos clínicos de cada paciente al diagnóstico y en el seguimiento tras tratamiento quirúrgico, a través de la revisión de historias clínicas:

- **Características clínicas:** plétora facial, cara de luna llena, lipomatosis cervical, estrías rojizas, grasa supraclavicular, acné, hirsutismo, fragilidad capilar, atrofia cutánea y muscular, edemas en miembros inferiores, astenia, labilidad emocional incluyendo la depresión, alteraciones menstruales, obesidad central, DM, HTA, dislipemia, osteoporosis con o sin fracturas, infecciones y ACV.
- **Determinaciones bioquímicas:** cortisol plasmático basal, CLU, cortisol plasmático nocturno, cortisol tras supresión con DXT y ACTH.
- **Pruebas radiológicas:** características del adenoma en RM hipofisaria o Tomografía axial computarizada (TAC) hipofisaria y resultados del cateterismo de senos petrosos.

Finalmente, se define remisión de EC cuando se alcanzan concentraciones de cortisol plasmático basal entre 2 y 5 µg/dl en el seguimiento postoperatorio, con normalización de CLU, determinación de cortisol tras 1 mg de DXT suprimida y normalización del ritmo de cortisol medida con la determinación de cortisol plasmático o salival nocturno. Existe persistencia cuando las concentraciones de cortisol plasmático basal tras la cirugía son mayores de 5 µg/dl y el CLU es superior al límite de normalidad. Se establece el diagnóstico de recurrencia cuando en el seguimiento, y tras remisión de EC, se detectan concentraciones de cortisol plasmático basal mayores de 5 µg/dl, CLU normal o en límite superior de normalidad y/o test de supresión con DXT alterado⁶⁵⁻⁶⁶.

3.3. Muestras de adenomas corticotropos.

Los adenomas corticotropos fueron extraídos mediante resección quirúrgica por vía transesfenoidal. Tras la cirugía, una porción del adenoma corticotropo fue transferida a

medio de cultivo S-MEM (Gibco, Madrid, España), estéril y frío (4-8°C), para su traslado al Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba.

En la sala de cultivos celulares y bajo condiciones de esterilidad, cada muestra fue troceada en cubos de 1-2 mm³ utilizando bisturís de un solo uso siguiendo protocolos descritos previamente por el grupo⁶⁷⁻⁶⁸. Posteriormente, una pequeña porción de estos fragmentos fue colocada en un criotubo, el cual se congeló a -80°C para la subsiguiente extracción de ARN, retro-transcripción y análisis del perfil de expresión génica.

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

Los fragmentos de tejido hipofisario congelados fueron procesadas para la extracción de ARN total utilizando el kit Absolutely RNA Miniprep (Stratagene, Madrid, España), siguiendo un procedimiento previamente descrito^{39,69}. El ARN total fue cuantificado mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EEUU) y retrotranscrito a ADN copia (ADNc) utilizando el kit Revert Aid First Strandc DNA Synthesis (MRI Fermentas, Hanover, MD, EEUU), siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

3.5. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qrtPCR).

Para el ensayo de *qrtPCR* se empleó la 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 stock 10µM) y 8,4µL de H₂O 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 durante 20 segundos) y unión de cebadores y elongación (60°C, 20 segundos). Además, para estar seguros de que el producto amplificado en la *qrtPCR* era específico, al finalizar todas las reacciones de PCR se obtuvo la curva de disociación de los productos amplificados y se secuenciaron los productos generados, obteniendo un resultado satisfactorio en todos los casos. Por último, para controlar las variaciones en la cantidad de muestra inicial de ARN total, se determinó la expresión de un gen housekeeping (β -actina) en cada una de las muestras incluidas en el presente estudio, cuyos niveles fueron usados

para normalizar los datos absolutos de número de copias de cada uno de los genes analizados en el estudio: POMC, SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-5, DR-1, DR-2T, DR-2L, DR-4 y DR-5.

3.6. Análisis estadístico.

Se empleó el programa estadístico SPSS para Windows versión 15.0 y se trabajó con significación estadística del 5%.

Para el análisis descriptivo de variables cualitativas se emplearon las frecuencias absolutas y el porcentaje para cada categoría. Las variables cualitativas se expresaron con su media \pm desviación típica ($m \pm DE$), su mediana \pm rango intercuartil ($me \pm RIC$), o rango en caso de que el cálculo de la $me \pm RIC$ no fuese posible, y se comprobó la normalidad de las mismas mediante el test de Shapiro-Wilk. Se utilizaron test no paramétricos para homogenizar el estudio, ya que la mayoría de las variables no seguía una distribución normal, y el tamaño de la muestra era menor de 30. Para estudiar la asociación entre variables cualitativas utilizamos chi cuadrado. Para la comparación de medias se utilizó la U de Mann Whitney. El estudio de correlación se realizó con Rho de Spearman.

4. RESULTADOS.

En el estudio se incluyeron 13 pacientes diagnosticados de EC, tratados con cirugía transesfenoidal y en los que el perfil molecular del tumor corticotropo fue estudiado.

4.1. Características basales.

Los 13 pacientes fueron mujeres con una edad media de $46,92 \pm 11,92$ años (me \pm RIC: 45 ± 23 años). La tasa de incidencia fue de 0,001-0,003 casos/habitantes/año en la provincia de Córdoba. La incidencia de EC por año se recoge en la tabla 3:

AÑO	n (%)
2005	1 (7,7)
2007	1 (7,7)
2008	1 (7,7)
2009	2 (15,4)
2010	3 (23,1)
2011	3 (23,1)
2012	2 (15,4)

Tabla 3. Incidencia de diagnóstico por año.

El tiempo desde el inicio de la clínica hasta diagnóstico fue de $36,6 \pm 27,29$ meses (me \pm RIC: 30 ± 36 meses) y el motivo de consulta más frecuente obesidad o sobrepeso (23,1%), DM-2 (15,4%). Índice de masa corporal (IMC): $30,51 \pm 7,68$ kg/m² (me \pm RIC: $27,91 \pm 6,78$ kg/m²). Se observó una EC cíclica en el 23,1% de los casos. La clínica presente al diagnóstico de EC se resume en la tabla 4, donde se muestra la frecuencia con la que se recoge cada signo y síntoma clínico en las historias clínicas de los pacientes, y porcentaje de aparición de cada uno de ellos.

Clínica	Pacientes	n (%)
Obesidad central	13	12 (92,3)
Plétora facial	10	8 (80)
Atrofia cutánea	9	7 (77,8)
Cara de luna llena	11	8 (72,78)

Astenia	9	9 (100)
Lipomatosis cervical	10	6 (60)
Labilidad emocional	8	7 (87,5)
Hirsutismo	9	7 (75,8)
Atrofia muscular	7	5 (71,4)
Amenorrea	7	5 (71,4)
Estrías rojizas	10	4 (40)
Grasa supraclavicular	6	3 (50)
Fragilidad capilar	7	3 (42,9)
Acné	5	3 (60)
Edemas en miembro inferiores	5	2 (40)
HTA	13	7 (53,8)
Dislipemia	13	6 (46,2)
DM-2	13	2 (23,1)
Osteoporosis	8	5 (62,5)
Fractura atípica	8	2 (15,4)
Infecciones	13	2 (15,4)
Accidente cerebrovascular	13	1 (7,7)

Tabla 4. Clínica al diagnóstico de la enfermedad de Cushing.

Las determinaciones bioquímicas al diagnóstico se muestran en la tabla 5. En concreto, al diagnóstico, presentaron determinación patológica de cortisol tras 1 mg de DXT el 92,3%, CLU el 92,3% y plasmático nocturno el 100% de los pacientes a los que se les realizó estas determinaciones. La supresión con DXT 2 mg y 8 mg fue patológica en el 100% de los casos en los que se realizó.

Determinaciones	Media ± Desviación estándar	Mediana ± Rango intercuartil
Cortisol basal (µg/dl)	17,8 ± 5,19	18,65 ± 4,64
Cortisol tras 1 mg de DXT (µg/dl)	12,64 ± 7,61	13,6 ± 14,23
Cortisol plasmático nocturno (µg/dl)	12,94 ± 4,01	12,8 ± 8,05

Cortisol libre urinario ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	$541,78 \pm 467,18$	$310 \pm 759,55$
Cortisol tras 2 mg de DXT ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	$14,77 \pm 12,39$	$14 \pm 10,15$
Cortisol tras 8 mg de DXT ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	$3,7 \pm 0,94$	$4,2 \pm 1,3$
ACTH (pg/ml)	$87,76 \pm 59,28$	$74,48 \pm 60,14$

Tabla 5. Determinaciones bioquímicas al diagnóstico.

En todos los pacientes se realizó RM hipofisaria con contraste salvo en una paciente que se realizó TAC hipofisaria con contraste por ser portadora de marcapasos. Los resultados obtenidos (macroadenomas 53,8%, microadenomas 30,8% y sin hallazgos 15,4%) se representan en la figura 1. El tamaño medio del adenoma fue de $11,8 \pm 6,64$ mm (me \pm RIC: $10 \pm 8,25\text{kg}/\text{m}^2$). En el 46,2% de los pacientes se realizó cateterismo de senos petrosos tras estimulación con vasopresina, indicado cuando no se detectó lesión en prueba de imagen hipofisaria o ésta fue menor de 6 mm. En todos ellos el gradiente de ACTH senos petrosos/periférico confirmó el diagnóstico de EC, y el cálculo del gradiente interpetroso indicó la localización del adenoma en el 83,3% de los casos: derecho 50% e izquierdo 33,3%.

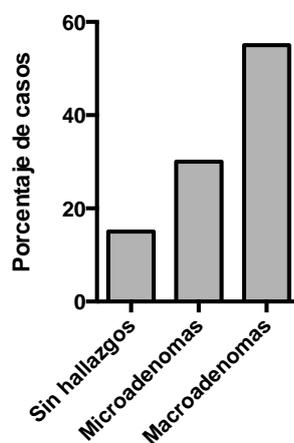


Figura 1. Porcentaje de lesiones en el estudio inicial de imagen.

El tratamiento médico prequirúrgico para controlar hipercortisolismo se realizó en el 92,3% de los pacientes y en todos los casos se indicó ketoconazol en monoterapia, con control bioquímico en el 69,2% de los casos. En dos pacientes se suspendió por toxicidad hepática. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el tratamiento quirúrgico fue de $106,15 \pm 76,5$ días (me \pm RIC: $94 \pm 119,5$ días). Los 13 pacientes recibieron tratamiento quirúrgico con abordaje transesfenoidal. Presentaron diabetes insípida transitoria el 23,1%

de ellos, siendo esta la única complicación en el postoperatorio inmediato. Las tres pacientes fueron tratadas con desmopresina intranasal hasta la resolución de la clínica. Ninguna de las 3 pacientes ha presentado recurrencia de EC en su seguimiento.

4.2. Estudio molecular del tumor corticotropo.

El perfil molecular de los 13 tumores corticotropos se estudió en el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Córdoba. En 4 de los fragmentos de tejido hipofisario obtenido a través del abordaje transesfenoidal pertenecientes a pacientes incluidos en el presente estudio (30,8%), se detectó un patrón de expresión compatible con hipófisis normal ya que se encontró un nivel significativo de expresión de ARNm de todas las hormonas hipofisarias y el patrón de expresión de SSTRs y DRs encontrado correspondía al típico patrón detectado previamente en otros estudios publicados por el grupo de investigación para hipófisis normales. En todos los casos se trataba de pacientes en los que el tamaño tumoral fue reducido (5-10 mm) y, de hecho, el 50% de ellos no presentó detección de lesión en el estudio de imagen hipofisaria. Por lo tanto, es probable que la muestra que se recogió para este estudio molecular no correspondiera al tumor corticotropo sino a un fragmento de tejido peritumoral (fragmentos de hipófisis normal). Consecuentemente, estos 4 pacientes fueron excluidos del estudio molecular perteneciente a los pacientes con EC. En la figura 2 se muestra la expresión de los receptores de SST y DA en los fragmentos de hipófisis normal y la expresión en tumores productores de ACTH. El nivel de expresión de estos receptores se muestra corregido por beta-actina. Se puede apreciar que el perfil de expresión de los distintos receptores difiere entre la hipófisis normal y los adenomas corticotropos. Concretamente, en tumores corticotropos existe una expresión predominante de DR-2, destacando la sobreexpresión SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3 en relación con la hipófisis normal, así como la mayor expresión de DR-1, DR-4 y DR-5. Por el contrario, nuestros datos indican que la expresión del DR-2L fue ligeramente superior en las hipófisis normales respecto a los tumores corticotropos mientras que la expresión de SSTR-5 no varió significativamente entre hipófisis normales y adenomas.

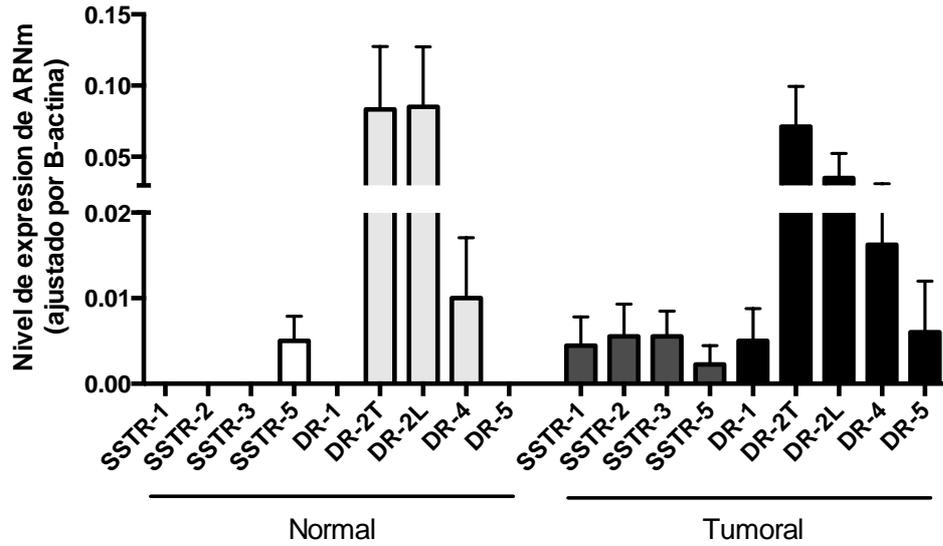


Figura 2. Expresión de receptores hormonales (SSTRs y DRs) en hipófisis normales y adenomascorticotropos (n=4-9). Los datos se presentan como media \pm SEM ajustados por la expresión del gen housekeeping.

En la Figura 3 se observa una clara sobreexpresión de POMC (corregida por beta-actina) en tumores corticotropos comparados con hipófisis normal, lo que confirman la validez y sensibilidad de la técnica utilizada.

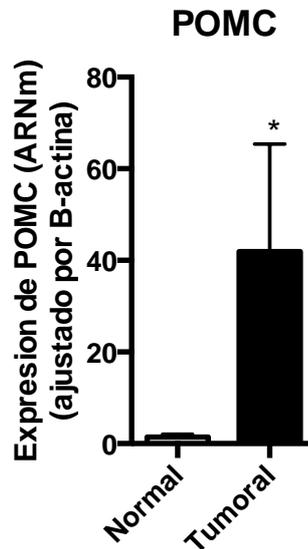


Figura 3. Expresión de POMC (ARNm) en hipófisis normal y en tumores corticotropos (n=4-9). Los datos se presentan como media \pm SEM ajustados por la expresión del gen housekeeping. Los asteriscos indican una $p < 0.005$.

4.3. Resultados post-cirugía transesfenoidal.

Se recogieron los datos del seguimiento postquirúrgico de los 9 pacientes en los que el perfil molecular del tumor fue compatible con adenoma hipofisario productor de ACTH.

En las 24-48 horas postquirúrgicas, el cortisol basal fue de $4,79 \pm 5,45$ $\mu\text{g/dl}$ (0,4-14,20 $\mu\text{g/dl}$). El 55,6% de los pacientes presentaron niveles de cortisol menor de 1,8 $\mu\text{g/dl}$ en el postoperatorio inmediato.

Las determinaciones bioquímicas postquirúrgicas se muestran en la tabla 6.

Determinaciones	Media \pm Desviación estándar	Rango
Cortisol basal ($\mu\text{g/dl}$)	$4,96 \pm 3,57$	1,4-14,2
Cortisol tras 1 mg de DXT ($\mu\text{g/dl}$)	$3,25 \pm 2,47$	0,50-5
Cortisol libre urinario ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	$16,96 \pm 17,09$	0,1-54

Tabla 6. Determinaciones bioquímicas al mes postquirúrgico.

Al mes, sólo en 22,2% mantenían niveles de cortisol menores de 1,8 $\mu\text{g/dl}$. De todos los pacientes, el 55,6% mantenían niveles de cortisol entre 2 y 5 $\mu\text{g/dl}$. Los niveles del CLU estaban normalizados en todos los casos. 2 pacientes precisaron tratamiento sustitutivo con hidrocortisona por insuficiencia suprarrenal secundaria, 2 presentaron hipotiroidismo secundario y 2 hipogonadismo hipogonadotropo. Sólo una paciente presentó los tres déficit postquirúrgicos.

Al mes de la intervención, una paciente presentó persistencia de EC iniciándose tratamiento con cabergolina al no detectarse imagen de adenoma en la RM hipofisaria y continuando con el tratamiento hasta el momento actual, con adecuado control de la EC y sin presentación de efectos secundarios.

En el seguimiento desde el tratamiento quirúrgico hasta la actualidad, han presentado recurrencia de EC el 33,3% de los pacientes. El tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica hasta el diagnóstico de recurrencia fue $50,33 \pm 43,43$ meses (13-98). En todos los casos, la determinación de cortisol tras 1 mg de DXT fue la primera en mostrarse patológica, y posteriormente la determinación de CLU. La RM hipofisaria mostró lesión en dos pacientes, microadenoma en ambos casos. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Determinaciones	Media \pm Desviación estándar	Rango
Cortisol tras 1 mg de DXT ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	4,33 \pm 2,58	2,6-7,3
Cortisol libre urinario ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	342 \pm 176,17	192-536
Tamaño lesión en RM hipofisaria (mm)	5,33 \pm 2,51	3-8

Tabla 7. Determinaciones bioquímicas e imagen de pacientes con recurrencia.

El tratamiento de la recurrencia de EC fue radioterapia estereotáxica fraccionada (REF) en la paciente con imagen hipofisaria de 3 mm, y reintervención quirúrgica transesfenoidal en las otras 2 pacientes. En uno de los casos persistió la EC tras la cirugía (cortisol basal postquirúrgico 26.38 $\mu\text{g}/\text{dl}$), y el segundo presentó recidiva a los 28 meses de la intervención. En ambos casos el tratamiento tras la cirugía fue REF. En la actualidad, las tres pacientes presentan persistencia de EC tras REF, estando las tres en tratamiento con ketoconazol y una de ellas en tratamiento combinado con cabergolina, pues desestimó iniciar tratamiento con pasireotida por deseo de fertilidad. El tiempo transcurrido desde finalizar REF es de $7,66 \pm 2,51$ meses.

Sólo en el caso de unas de las pacientes reintervenidas podemos comparar el estudio molecular del primer adenoma con el de la reintervención (tabla 8):

RECEPTORES	Muestra inicial	Muestra recurrencia
SSTR-1	0,000346	0,000145
SSTR-2	0,000031	0,0000050
SSTR-5	0,000267	0,014458
DR-1	0,000038	0,000036
DR-2T	0,044593	0,028516
DR-4	0,000022	0,010878

Tabla 8. Cuantificación de receptores en las dos muestras distintas, cirugía inicial y reintervención por recurrencia de enfermedad de Cushing.

Se puede apreciar que existen diferencias cuantitativas en los niveles de expresión de los receptores que se expresan en dos muestras distintas de una misma paciente (cirugía inicial y reintervención por recurrencia de EC). Concretamente, la expresión de SSTR-1,

SSTR-2 y DR-2T fue mayor en la muestra inicial, mientras que por el contrario la expresión de SSTR-5 y DR-4 fue llamativamente mayor en la muestra obtenida tras la recurrencia. El único receptor cuya expresión no varió entre la muestra inicial y en la muestra obtenida tras la recurrencia del tumor fue el DR-1.

Ninguna paciente ha fallecido durante el periodo monitorizado. El 55,6% de los pacientes presenta remisión de EC tras la cirugía transesfenoidal y en dos casos se presentó una insuficiencia suprarrenal secundaria. El 45,5% presenta persistencia de la enfermedad en el momento actual, tras recurrencia de EC en 3 de los casos y uno de ellos sin remisión tras la cirugía inicial. Las 4 pacientes están en tratamiento médico en la actualidad: 50% ketoconazol, 25% cabergolina y 25% con tratamiento combinado de ambos fármacos. Sólo una de las pacientes en monoterapia con ketoconazol y otra con cabergolina en monoterapia presenta normalización de hipercortisoluria en la última revisión.

En la tabla 9 se presenta la prevalencia de síndrome metabólico y depresión en todas las pacientes junto con la situación actual de la EC.

Clínica	n (%)	Pacientes con recurrencia	Pacientes en remisión
DM-2	2 (22,2)	2	7
HTA	4 (44,4)	3	6
Dislipemia	3 (33,3)	2	7
Sobrepeso/obesidad	4 (44,4)	3	6
Depresión	1 (1)	1	8

Tabla 9. Prevalencia de síndrome metabólico, depresión y estado de enfermedad de Cushing.

No se observó asociación entre el nivel de cortisol postquirúrgico y recurrencia de EC (chi cuadrado= 4; p=0,143). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de receptores de SST y DA entre las pacientes que presentaron remisión o recurrencia de EC.

4.4. Correlación entre los datos clínicos y el patrón de expresión molecular.

Se realizó el estudio de correlación con Rho de Spearman, asumiendo la necesidad de utilizar pruebas no paramétricas en nuestra muestra. Se observó una correlación inversa fuerte entre los niveles de CLU al diagnóstico y distintos receptores: SSTR-1 [rho= -0,733

($p=0,025$), SSTR-3 [$\rho= -0,745$ ($p=0,021$)], DR-1 [$\rho= -0,833$ ($p=0,01$)], DR-4 [$\rho= -0,946$ ($p=0,000$)] y DR-5 [$\rho= -0,943$ ($p=0,005$)]. El nivel de cortisol plasmático nocturno al diagnóstico presentó correlación inversa fuerte con DR-4 [$\rho= -0,900$ ($p=0,037$)] y DR-5 [$\rho= -1$ ($p=0,01$)]. También se observó una correlación inversa muy significativa entre los niveles de ACTH al diagnóstico y el receptor SSTR-5 [$\rho= -0,767$ ($p=0,016$)]. Se observó una correlación positiva entre el tamaño tumoral al diagnóstico y los receptores SSTR-2 [$\rho= 0,731$ ($p=0,04$)], SSTR-3 [$\rho= 0,735$ ($p=0,038$)], DR-2T [$\rho= 0,821$ ($p=0,023$)], DR-4 [$\rho= -0,946$ ($p=0,000$)] y DR-5 [$\rho= 0,900$ ($p=0,037$)]. El IMC presentó correlación positiva fuerte con POMC [$\rho= 1$ ($p=0,01$)].

5. DISCUSIÓN

La EC es un estado de hipercortisolismo causado por un adenoma hipofisario secretor de ACTH. Es una enfermedad rara, con una incidencia de 0,7-2,4 casos por millón de habitantes al año²⁻⁴. Su diagnóstico es más frecuente durante la tercera y cuarta décadas de la vida, siendo hasta ocho veces más frecuente en el sexo femenino⁵. En pacientes con EC, la duración del hipercortisolismo parece estar inversamente relacionada con la reversibilidad de las complicaciones, que a su vez pueden aumentar la mortalidad. Por ello, el diagnóstico precoz y el tratamiento del hipercortisolismo crónico son de suma importancia. Sin embargo, la EC sigue siendo un reto para el clínico en el manejo diagnóstico y terapéutico. Por lo tanto, el objetivo principal del presente estudio fue determinar si los datos clínicos, al tiempo del diagnóstico, de los pacientes con EC pueden predecir el patrón de expresión de receptores hormonales (SST y DA) a nivel del adenoma corticotropo, para así poder iniciar un tratamiento médico eficaz y personalizado que consiga la reducción de los niveles de cortisol en el menor tiempo posible.

La mayoría de los pacientes de nuestra serie se diagnosticaron en la cuarta década de la vida y todas fueron mujeres. La tasa de incidencia fue de 0,001-0,003 casos/habitantes/año en la provincia de Córdoba. La clínica de estos pacientes con EC fue la común para el SC. La recogida de estos datos para el presente estudio fue dificultosa e incompleta, principalmente la recogida de los síntomas clínicos, ya que no en todos los pacientes se describían. Este hecho hace reflexionar sobre la necesidad de realizar historias clínicas de forma sistematizada, para facilitar y hacer más fructíferos posibles estudios posteriores.

Los estudios de expresión génica indicaron la existencia de tumor en la pieza quirúrgica analizada molecularmente en 9 de las 13 muestras obtenidas, en las que la expresión de POMC estaba claramente elevada, en comparación a hipófisis normales. Además, estos datos de expresión confirmaron el hecho de que los adenomas productores de ACTH expresan predominantemente DR-2. Sin embargo, los datos de esta serie no son consistentes con datos previos que indican que los adenomas hipofisarios corticotropos presentan un predominio de la expresión de SSTR-5 y niveles relativamente bajos de SSTR-2⁴⁰. Los análisis realizados mostraron una correlación positiva entre el IMC y la expresión de POMC en el tumor, lo que podría sugerir que mayores niveles de POMC, y consecuentemente ACTH, en estos pacientes podría aumentar su predisposición a la obesidad.

En esta serie, la presencia de macroadenomas fue del 53,8%, lo que supone un porcentaje superior al descrito en la literatura para los adenomas hipofisarios (85-87% son

microadenomas y el 13-15% restantes son macroadenomas⁶⁰. Cabe destacar que los análisis realizados revelaron una correlación positiva entre el tamaño tumoral al diagnóstico y los receptores SSTR-2, SSTR-3, DRD2T, DR-4 y DR-5. Esto sugiere que en pacientes con EC en los que se detecta un macroadenoma en el estudio inicial, podría ser útil el tratamiento prequirúrgico con SSA y/o DA en combinación o monoterapia, aunque hasta el momento, no se ha demostrado control del hipercortisolismo en pacientes con EC tratados con octreotida⁴².

Además, nuestros datos indican una correlación inversa entre los niveles de hipercortisoluria determinados por CLU al diagnóstico y los receptores SSTR-1, SSTR-3, DR-1, DR-4 y DR-5, sin detectarse esta correlación negativa con los niveles de SSTR-2 descrita por otros autores⁴¹. El nivel de cortisol nocturno también presentó correlación inversa fuerte con los receptores DR-4 y DR-5. Además, se observó una correlación inversa entre los niveles de ACTH al diagnóstico y el SSTR-5, lo que podría sugerir que pasireotida (un SSA con alta afinidad por el SSTR-5) no sería una buena opción terapéutica en el tratamiento prequirúrgico de la EC.

También se observa que el patrón de expresión génica está alterado entre dos muestras tumorales de una misma paciente, procedentes de la intervención inicial y de la intervención de la recurrencia de EC. Este hecho puede explicar que la respuesta terapéutica con un mismo fármaco sea diferente en un mismo paciente durante la evolución de la EC, y realza la importancia de realizar el estudio molecular de estos tumores, para poder diseñar un tratamiento más personalizado y, en consecuencia, más eficaz.

Como objetivo secundario se determinó si el estudio de receptores de tumores corticotropos puede predecir la curación o recurrencia de la EC tras la cirugía. La recurrencia de EC es frecuente, con mayor incidencia a los 2,3-7,2 años tras la cirugía, con curación en el 60-65% según las series²⁵. En nuestra serie, el 55,5% presentó remisión de EC tras la cirugía, el 11,1% persistencia y el 33,3% recurrencia en un periodo de tiempo de $50,33 \pm 43,43$ meses tras la cirugía. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los patrones de expresión de los receptores de SST y DA entre las pacientes que presentaron remisión o recurrencia de EC.

Se ha descrito que niveles de cortisol plasmático inferiores a 1,8 µg/dl en el postoperatorio inmediato se asocian con curación a largo plazo²⁷. En nuestro estudio, no se ha observado esta asociación.

No obstante, estudios en los que se incluyan un mayor número de pacientes deben ser realizados para confirmar los resultados obtenidos en este estudio.

6. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos del presente estudio podemos concluir que:

1. Existe una correlación positiva entre el tamaño del tumor corticotropo y la expresión de SSTR-2, SSTR-3, DR-2T, DR-4 y DR-5, hecho que sugiere que en pacientes con EC que presenten un tamaño tumoral considerable en las pruebas de imagen, principalmente macroadenomas, podría considerarse iniciar tratamiento prequirúrgico con SSA y agonistas dopaminérgicos, combinados con ketoconazol o en monoterapia.
2. Existe una correlación inversa entre los niveles de ACTH y SSTR-5, pudiendo considerar que pasireotida no sería una opción terapéutica a tener en cuenta en el tratamiento prequirúrgico de la EC.
3. El estudio de receptores de SST y DA del adenoma corticotropo incluido en el presente estudio no permite seleccionar, a priori, a pacientes con mayor riesgo de recurrencia de la EC.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Patil CG, Prevedello DM, Lad SP, Vance ML, Thorner MO, Katznelson L, Leyes ER. Late recurrences of Cushing's disease after initial successful transsphenoidal surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(2): 358-362.
2. Bertagna X, Guignat L, Groussin L, Bertherat J. Cushing's disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23 (5): 607-623.
3. Lindholm J, Juul S, Jorgensen JO, Astrup J, Bjerre P, Feldt-Rasmussen U, Hagen C, Jorgensen J, Kosteljanetz M, L Kristensen, Laurberg P, K Schmidt, Weeke J. Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(1): 117-123.
4. Steffesen C, Bak AM, Rubeck KZ, Jorgensen JO. Epidemiology of Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology.* 2010; 92(Suppl 1): 1-5.
5. Mindermann T, Wilson CB. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994; 41(3): 359-364.
6. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet.* 2006; 367(9522): 1605-1617.
7. Clayton RN. Mortality in Cushing's disease. *Neuroendocrinology.* 2010; 92(Suppl 71): 71-76.
8. Hammer GD, Tyrrell JB, Lamborn KR, Applebury CB, Hannegan ET, Bell S, Rahl R, Lu A, Wilson CB. Transsphenoidal microsurgery for Cushing's disease: initial outcome and long-term results. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(12): 6348-6357.
9. Swearingen B, Biller BM, Barker FG II, Katznelson L, Grinspoon S, Klibanski A, Zervas NT. Long-term mortality after transsphenoidal surgery for Cushing disease. *Ann Intern Med.* 1999; 130(10): 821-824.
10. Bolland MJ, Holdaway IM, Berkeley JE, Lim S, Dransfield WJ, Conaglen JV, Croxson MS, Gamble GD, Hunt PJ, Toomath RJ. Mortality and morbidity in Cushing's syndrome in New Zealand. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011; 75(4): 436-442.

11. Hassan-Smith ZK, Sherlock M, Reulen RC, Arlt W, Ayuk J, Toogood AA, Cooper MS, Johnson AP, Stewart PM. Outcome of Cushing's disease following transsphenoidal surgery in a single center over 20 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(4): 1194-1201.
12. Feelders RA, Pulgar SJ, Kempel A, Pereira AM. The burden of Cushing's disease (CD): clinical and health-related quality of life aspects. *Eur J Endocrinol.* 2012; 167(3): 311-326.
13. Faggiano A, Pivonello R, Spiezia S, De Martino MC, Filippella M, Di Somma C, Lombardi G, Colao A. Cardiovascular risk factors and common carotid artery caliber and stiffness in patients with Cushing's disease during active disease and 1 year after disease remission. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(6): 2527-2533.
14. Mancini T, Kola B, Mantero F, Boscaro M, Arnaldi G. High cardiovascular risk in patients with Cushing's syndrome according to 1999 WHO/ISH guidelines. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004; 61(6): 768-777.
15. Colao A, Pivonello R, Spiezia S, Faggiano A, Ferone D, Filippella M, Marzullo P, Cerbone G, Siciliani M, Lombardi G. Persistence of increased cardiovascular risk in patients with Cushing's disease after five years of successful cure. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(8): 2664-2672.
16. van der Pas R, de Bruin C, Leebeek FW, de Maat MP, Rijken DC, Pereira AM, Romijn JA, Netea-Maier RT, Hermus AR, Zelissen PM, de Jong FH, van der Lely AJ, de Herder WW, Lamberts SW, Hofland LJ, Feelders RA. The hypercoagulable state in Cushing's disease is associated with increased levels of procoagulant factors and impaired fibrinolysis, but is not reversible after short-term biochemical remission induced by medical therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(4): 1303-1310.
17. Manetti L, Bogazzi F, Giovannetti C, Raffaelli V, Genovesi M, Pellegrini G, Ruocco L, Iannelli A, Martino E. Changes in coagulation indexes and occurrence of venous thromboembolism in patients with Cushing's syndrome: results from a prospective study before and after surgery. *Eur J Endocrinol.* 2010; 163(5): 783-791.

18. Di Somma C, Pivonello R, Loche S, Faggiano A, Klain M, Salvatore M, Lombardi G, Colao A. Effect of 2 years of cortisol normalization on the impaired bone mass and turnover in adolescent and adult patients with Cushing's disease: a prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; 58(3): 302-308.
19. Dorn LD, Burgess ES, Friedman TC, Dubbert B, Gold PW, Chrousos GP. The longitudinal course of psychopathology in Cushing's syndrome after correction of hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(3): 912-919.
20. Pereira AM, Tiemensma J, Romijn JA. Neuropsychiatric disorders in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*. 2010; 92(suppl 1): 65-70.
21. van Aken MO, Pereira AM, Biermasz NR, van Thiel SW, Hoftijzer HC, Smit JW, Roelfsema F, Lamberts SW, Romijn JA. Quality of life in patients after long-term biochemical cure of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(6): 3279-3286.
22. Feelders RA, Hofland LJ. Medical Treatment of Cushing's Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(2): 425-438.
23. Dekkers OM, Biermasz NR, Pereira AM, Roelfsema F, van Aken MO, Voormolen JH, Romijn JA. Mortality in patients treated for Cushing's disease in increased, compared with patients treated for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92(3): 976-981.
24. Webb SM, Badia X, Barahona MJ, Colao A, Strasburger CJ, Tabarin A, van Aken MO, Pivonello R, Stalla T, Lamberts SW, Glusman JE. Evaluation of health-related quality of life in patients with Cushing's syndrome with a new questionnaire. *Eur J Endocrinol*. 2008; 158(5): 623-630.
25. Biller BM, Grossman AB, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J, Buchfelder M, Colao A, Hermus AR, Hofland LJ, Klibanski A, Lacroix A, Lindsay JR, Newell-Price J, Nieman LK, Petersenn S, Sonino N, Stalla GK, Swearingen B, Vance ML, Wass JA, Boscaro M. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(7): 2454-2462.

26. Laws ER, Reitmeyer M, Thapar K, Vance ML. Cushing's disease resulting from pituitary corticotrophic microadenoma: treatment results from transsphenoidal microsurgery and gamma knife radiosurgery. *Neurochirurgie*. 2002; 48(2-3): 294-299.
27. Trainer PJ, Lawrie HS, Verhelst J, Howlett TA, Lowe DG, Grossman AB, Savage MO, Afshar F, Besser GM. Transsphenoidal resection in Cushing's disease: undetectable serum cortisol as the definition of successful treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1993; 38(1): 73-78.
28. Atkinson AB, Kennedy A, Wiggam MI, McCance DR, Sheridan B. Long-term remission rates after pituitary surgery for Cushing's disease: the need for long-term surveillance. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005; 63(5): 549-559.
29. Alwani RA, de Herder WW, van Aken MO, van den Berge JH, Delwel EJ, Dallenga AH, De Jong FH, Lamberts SW, van der Lely AJ, Feelders RA. Biochemical predictors of outcome of pituitary surgery for Cushing's disease. *Neuroendocrinology*. 2010; 91(2): 169-178.
30. Chee GH, Mathias DB, James RA, Kendall-Taylor P. Transsphenoidal pituitary surgery in Cushing's disease: can we predict outcome?. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001; 54(5): 617-626.
31. Carrasco CA, Coste J, Guignat L, Groussin L, Dugué MA, Gaillard S, Bertagna X, Bertherat J. Midnight salivary cortisol determination for assessing the outcome of transsphenoidal surgery in Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(12): 4728-4734.
32. Luque RM, Ibáñez-Costa A, López-Sánchez LM, Jiménez-Reina L, Venegas-Moreno E, Gálvez MA, Villa-Osaba A, Madrazo-Atutxa AM, Japón MA, de la Riva A, Cano DA, Benito-López P, Soto-Moreno A, Gahete MD, Leal-Cerro A, Castaño JP. 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*. 2013; 98(10): 4160-4169.

33. Losa M, Bianchi R, Barzaghi R, Giovanelli M, Mortini P. Persistent adrenocorticotropin response to desmopressin in the early post-operative period predicts recurrence of Cushing's disease. *Endocrinol Metab.* 2009; 94(9): 3322-3328.
34. Castinetti F, Martinie M, Morange I, Dufour H, Sturm N, Passagia JG, Conte-Devolx B, Chabre O, Brue TA combined dexamethasone desmopressin test as an early marker of postsurgical recurrence of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(6): 1897-1903.
35. Labeur M, Paez-Pereda M, Arzt E, Stalla GK. Potential of retinoic acid derivatives for the treatment of corticotroph pituitary adenomas. *Rev Endocr Metab Disord.* 2009; 10(2): 103-109.
36. Schteingart DE. Drugs in the medical treatment of Cushing's syndrome. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2009; 14(4): 661-671.
37. Ben-Shlomo A, Melmed S. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21(3): 123-33.
38. de Bruin C, Pereira AM, Feelders RA, Romijn JA, Roelfsema F, Sprij-Mooij DM, van Aken MO, van der Lelij AJ, de Herder WW, Lamberts SW, Hofland LJ. Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(4): 1118-1124.
39. Duran-Prado M, Gahete MD, Martinez-Fuentes AJ, Luque RM, Quintero A, Webb SM, Benito-López P, Leal A, Schulz S, Gracia-Navarro F, Malagón MM, Castaño JP. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(7): 2634-2643.
40. Tateno T, Kato M, Tani Y, Oyama K, Yamada S, Hirata Y. Differential expression of somatostatin and dopamine receptor subtype genes in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors and silent corticotroph adenomas. *Endocr J.* 2009; 56(4): 579-584.

41. de Bruin C, Feelders RA, Waaijers AM, van Koetsveld PM, Sprij-Mooij DM, Lamberts SW, Hofland LJ. Differential regulation of human dopamine D2 and somatostatin receptor subtype expression by glucocorticoids in vitro. *J Mol Endocrinol.* 2009; 42(1): 47-56.
42. Stalla GK, Brockmeier SJ, Renner U, Newton C, Buchfelder M, Stalla J, Müller OA. Octreotide exerts different effects in vivo and in vitro in Cushing's disease. *Eur J Endocrinol.* 1994; 130(2): 125-131.
43. Hofland LJ, van der Hoek J, Feelders R, van Aken MO, van Koetsveld PM, Waaijers M, Sprij-Mooij D, Bruns C, Weckbecker G, de Herder WW, Beckers A, Lamberts SW. The multi-ligand somatostatin analogue SOM230 inhibits ACTH secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152(4): 645-654.
44. Boscaro M, Ludlam WH, Atkinson B, Glusman JE, Petersenn S, Reincke M, Snyder P, Tabarin A, Biller BM, Findling J, Melmed S, Darby CH, Hu K, Wang Y, Freda PU, Grossman AB, Frohman LA, Bertherat J. Treatment of pituitary dependent Cushing's disease with the multireceptor ligand somatostatin analog pasireotide (SOM230): a multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(1): 115-122.
45. Feelders RA, de Bruin C, Pereira AM, Romijn JA, Netea-Maier RT, Hermus AR, Zelissen PM, van Heerebeek R, de Jong FH, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ, Lamberts SW. Pasireotide alone or with cabergoline and ketoconazole in Cushing's disease. *N Engl J Med.* 2010; 362(19): 1846-1848.
46. Colao A, Petersenn S, Newell-Price J, Findling JW, Gu F, Maldonado M, Schoenherr U, Mills D, Salgado LR, Biller BM; Pasireotide B2305 Study Group. A 12-month phase 3 study of pasireotide in Cushing's disease. *N Engl J Med.* 2012; 366(10): 914-924.
47. Bertherat J, Schopohl J, Ludlam WH, et al. Long-term pasireotide use leads to significant and sustained improvements in the signs and symptoms of Cushing disease: 24-month results from a randomized phase III study. *Endocr Rev.* 2012; 33(suppl): SUN-734.

48. Saveanu A, Jaquet P. Somatostatin-dopamine ligands in the treatment of pituitary adenomas. *Rev Endocr Metab Disord.* 2009; 10(2): 83-90.
49. Boschetti M, Gatto F, Arvigo M, Esposito D, Reborá A, Talco M, Albertelli M, Nazzari E, Goglia U, Minuto F, Ferone D. Role of dopamine receptors in normal and tumoral pituitary corticotrophic cells and adrenal cells. *Neuroendocrinology.* 2010; 92(Suppl 1): 17-22.
50. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998; 78(1): 189-225.
51. Pivonello R, Ferone D, de Herder WW, Kros JM, De Caro ML, Arvigo M, Annunziato L, Lombardi G, Colao A, Hofland LJ, Lamberts SW. Dopamine receptor expression and function in corticotroph pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(5): 2452-2462.
52. Neto LV, Machado Ede O, Luque RM, Taboada GF, Marcondes JB, Chimelli LM, Quintella LP, Niemeyer P Jr, de Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR 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): 1931-1937.
53. Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferre S, Fuxe K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem.* 2002; 277(20): 18091-18097.
54. Miller JW, Crapo L. The medical treatment of Cushing's syndrome. *Endocr Rev.* 1993; 14(4): 443-458.
55. Vilar L, Naves LA, Azevedo MF, Arruda MJ, Arahata CM, Moura E Silva L, Agra R, Pontes L, Montenegro L, Albuquerque JL, Canadas V. Effectiveness of cabergoline in monotherapy and combined with ketoconazole in the management of Cushing's disease. *Pituitary.* 2010; 13(2): 123-129.

56. Pivonello R, De Martino MC, Cappabianca P, De Leo M, Faggiano A, Lombardi G, Hofland LJ, Lamberts SW, Colao A. The medical treatment of Cushing's disease: effectiveness of chronic treatment with the dopamine agonist cabergoline in patients unsuccessfully treated by surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(1): 223-230.
57. Godbout A, Manavela M, Danilowicz K, Beauregard H, Bruno OD, Lacroix A. Cabergoline monotherapy in the long-term treatment of Cushing's disease. *Eur J Endocrinol.* 2010; 163(5): 709-716.
58. Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of heterooligomers with enhanced functional activity. *Science.* 2000; 288(5463): 154-157.
59. Boscaro M, Arnaldi T. Approach to the patient with possible Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(9): 3121-3131.
60. Saeger W, Lüdecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ, Petersenn S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol.* 2007; 156(2): 203-216.
61. Wiggam MI, Heaney AP, McIlrath EM, McCance DR, Sheridan B, Hadden DR, Atkinson AB. Bilateral inferior petrosal sinus sampling in the differential diagnosis of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a comparison with other diagnostic tests. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(4): 1525-1532.
62. Bonelli FS, Huston J, Carpenter PC, Erickson D, Young WF, Meyer FB. Adrenocorticotropin hormone dependent Cushing's syndrome: sensitivity and specificity of inferior petrosal sinus sampling. *Am J Neuroradiol.* 2000; 21(4): 690-696.
63. Lad SP, Patil CG, Laws ER, Katznelson L. The role of inferior petrosal sinus sampling in the diagnostic localization of Cushing's disease. *Neurosurg Focus.* 2007; 23 (3): E2.
64. Kaltsas GA, Giannulis MG, Newell-Price JD, Dacie JE, Thakkar C, Afshar F, Monson JP, Grossman AB, Besser GM, Trainer PJ. A critical analysis of the value of simultaneous inferior petrosal sinus sampling in Cushing's disease and the occult ectopic adrenocorticotropin syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(2): 487-492.

65. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 1526-1540.
66. Abellán P, Fajardo C, Riesgo PA, Gómez J, Meseguer C, Rovira V. Predictors of long-term remission after transsphenoidal surgery in Cushing's disease. *Endocrinol Nutr.* 2013; 60(8): 475-482.
67. Luque RM, Park S, Kineman RD. 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): 300-309.
68. Martínez-Fuentes AJ, Moreno-Fernández J, Vázquez-Martínez R, Durán-Prado M, de la Riva A, Tena-Sempere M, Diéguez C, Jiménez-Reina L, Webb SM, Pumar A, Leal-Cerro A, Benito-López P, Malagón MM, Castaño JP. Ghrelin is produced by and directly activates corticotrope cells from adrenocorticotropin-secreting adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(6): 2225-2231.
69. Castinetti F, Martinie M, Morange I, Dufour H, Sturm N, Passagia JG, Conte-Devolx B, Chabre O, Brue TA combined dexamethasone desmopressin test as an early marker of postsurgical recurrence of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(6): 1897-1903.