

UNIVERSITAT DE VALENCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Cirurgia



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado 3042 - MEDICINA - 444 Tumores cerebrales: estudio genético  
e inmunohistoquímico

---

DESCRIPCIÓN DEL PERFIL METABÓLICO DE ADENOMAS HIPOFISARIOS  
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA “EX-VIVO”, POR RESONANCIA MAGNÉTICA  
DE ALTA RESOLUCIÓN CON ROTACIÓN AL ÁNGULO MÁGICO

---

D. Pedro Antonio Riesgo Suárez

Directores:

Dr. D. Pedro Luis Roldán Badía

Dr. D. Bernardo Celda Muñoz

Dr. D. José Piquer Belloch

Valencia, enero de 2017



D. PEDRO LUIS ROLDÁN BADÍA, Profesor Titular de Neurocirugía del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de Valencia; D. BERNARDO CELDA MUÑOZ, Catedrático de Química Física del Departamento de Química Física de la Universitat de Valencia y D. JOSE PIQUER BELLOCH, Profesor Titular de Neuroanatomía y Neurocirugía de la Universidad CEU-Cardenal Herrera de Valencia y Director de la Cátedra de Neurociencias CEU-Fundación NISA.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Descripción del perfil metabólico de adenomas hipofisarios mediante espectroscopia “ex vivo”, por resonancia magnética de alta resolución con rotación al ángulo mágico”, realizado bajo nuestra dirección en este departamento por D. Pedro Antonio Riesgo Suárez, licenciado en Medicina y Cirugía por la Universitat de Valencia, reúne a nuestro juicio los requisitos necesarios para su presentación y defensa pública para optar al título de Doctor en Medicina.

Y para que así conste y obre a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado a 16 de enero de 2017.

Fdo: Prof. Dr. D. P. Roldán Badía   Fdo: Prof. Dr. D. Bernardo Celda Muñoz   Fdo: Prof. Dr. D. José Piquer Belloch



## AGRADECIMIENTOS

A mis directores: Pedro Roldán, Jose Piquer y Bernardo Celda. Gracias al empuje de Jose, se puso finalmente en marcha y se hizo realidad este trabajo. A Bernardo por todo. También, junto con ellos, a Antonio Cremades por su aportación con la histopatología y la inmunohistoquímica, a Daniel Monleón por su colaboración en el análisis estadístico de los datos de RM HR-MAS, a Carmiña Fajardo por su amistad y orientación neuro-endocrinológica y a Paco Tarazona por haber supervisado la estructura de la tesis. A los expertos que han revisado, aportado mejoras y aprobado la defensa de la misma, por su disponibilidad y ayuda: Guillermo García-March, Javier Salvador, Carmiña Fajardo, Pilar López, Daniel Monleón, José Luis Llácer, Vicente Joanes y Pablo González.

A mis padres por darme la vida, cuidarme, hacer posibles mis estudios y seguir estando ahí. A Cuqui y a nuestros hijos, María y Pablo, porque esto no hubiese sido posible sin vuestro cariño y porque sois la razón de todo. A mi hermana Marta y a todo el resto de mi familia y amigos.

A mi otra familia, la del trabajo de cada día. A Jose, José Luis, Vicente y Rubén por la convivencia de años y el apoyo continuo. A los neurocirujanos que me formaron y muy especialmente a los que ya no están. A Paco Cortés y Jerónimo Cabanes. A mis “mamás” en la cirugía: Asun, María y Mari Carmen. Al resto de personas con las que he compartido y comparto tiempo y trabajo en “mis” hospitales por su esfuerzo, con especial agradecimiento a enfermeras, enfermeros, auxiliares y celadores. Al Hospital Universitario de La Ribera como institución, por haber puesto a nuestra disposición los medios y haber facilitado el desarrollo de una actividad específica en el campo de la cirugía hipofisaria, de la que es fruto este trabajo.

A todas las personas que estando enfermas y atravesando momentos difíciles confiaron en mi y permitieron que fuese su médico y las operase. En especial, a aquellos que tuvieron que enfrentarse a dificultades y complicaciones. A Elena.



## ÍNDICE

Lista de símbolos, abreviaturas y citas	13
1. Introducción	21
1.1. Metabolómica	23
1.1.1. Concepto	24
1.1.2. Aproximaciones en metabolómica	25
1.1.2.1. Medida de la huella metabólica	25
1.1.2.2. Perfil metabolómico	25
1.1.3. Aplicaciones de la metabolómica	26
1.1.4. Fases del experimento metabolómico	27
1.1.4.1. Diseño del experimento	27
1.1.4.2. Medidas analíticas	27
1.1.4.3. Procesado de señal	28
1.1.4.4. Identificación de biomarcadores	28
1.2. Espectroscopia de RMN	31
1.2.1. Fundamentos físicos de la RMN	31
1.2.1.1. Magnetismo nuclear	31
1.2.1.2. Resonancia magnética nuclear	31
1.2.1.3. Desplazamiento químico	32
1.2.2. Espectrómetro de RMN	34
1.2.3. Espectro de RMN de $^1\text{H}$	35
1.2.3.1. Curva de integración	35
1.2.3.2. Desacoplamiento espín-espín	35
1.2.3.3. Constantes de acoplamiento	36
1.2.4. RMN de sólidos. La RMN con giro al ángulo mágico	36
1.3. ERM $^1\text{H}$ en el estudio del SNC	39
1.3.1. ERM $^1\text{H}$ in-vivo	39
1.3.2. ERM $^1\text{H}$ in-vitro	42
1.3.3. ERM $^1\text{H}$ ex-vivo	42

1.4. Bases de anatomía y fisiología de la hipófisis	45
1.4.1. Anatomía hipotálamo-hipofisaria	45
1.4.2. Función hipofisaria	45
1.4.3. Hormonas hipofisarias	47
1.5. Adenomas hipofisarios	49
1.5.1. Epidemiología	49
1.5.2. Patogenia	51
1.5.2.1. Alteraciones en la regulación hormonal	51
1.5.2.2. Alteraciones de receptores hormonales	52
1.5.2.3. Desregulación de factores de crecimiento y sus receptores	53
1.5.2.4. Activación de oncogenes	53
1.5.2.5. Genes supresores de tumores	54
1.5.2.6. Alteraciones de la señal mediada por proteínas	55
1.5.2.7. Alteraciones en la interrelación entre las células tumorales y el estroma	55
1.5.3. Características clínicas y criterios diagnósticos	56
1.5.3.1. Prolactinomas	56
1.5.3.2. Acromegalia	58
1.5.3.3. Enfermedad de Cushing	60
1.5.3.4. Gonadotropinomas	65
1.5.3.5. Tirotropinomas	66
1.5.3.6. Adenomas no funcionantes	67
1.5.4. Diagnóstico por imagen	69
1.5.4.1. RMN hipofisaria	69
1.5.4.2. ERM <sup>1</sup> H	77
1.5.5. Anatomía patológica	78
1.5.5.1. Perspectiva histórica / Antecedentes	78
1.5.5.2. Clasificación ultraestructural	80
1.5.5.2.1. Adenomas productores de GH	80
1.5.5.2.2. Adenomas productores de PRL	84
1.5.5.2.3. Adenomas productores de TSH	85
1.5.5.2.4. Adenomas productores de ACTH	86

	9	
1.5.5.2.5.	Adenomas productores de gonadotropinas	88
1.5.5.2.6.	Adenomas “null cell”	88
1.5.5.2.7.	Adenomas plurihormonales	89
1.5.5.3.	Clasificación de la WHO	89
1.5.6.	Tratamiento	90
1.5.6.1.	Tratamiento quirúrgico	91
1.5.6.2.	Tratamiento médico	95
1.5.6.3.	Tratamiento radioterápico	100
2.	Hipótesis de trabajo. Objetivos	103
2.1.	Hipótesis de trabajo. Interés de la tesis	105
2.2.	Objetivos	109
3.	Material y métodos	111
3.1.	Selección de casos	113
3.1.1.	Criterios de inclusión	113
3.1.2.	Criterios de exclusión	102
3.2.	Variables de estudio	115
3.2.1.	Variables demográficas	115
3.2.1.1.	Fecha de nacimiento	115
3.2.1.2.	Edad del paciente	115
3.2.1.3.	Género	115
3.2.2.	Variables clínicas	115
3.2.2.1.	Clasificación de los adenomas hipofisarios en función de su patrón de secreción hormonal	115
3.2.2.2.	Agresividad tumoral en función de su ritmo de crecimiento	115
3.2.3.	Variables radiológicas	115
3.2.3.1.	Tamaño tumoral	115
3.2.3.2.	Invasividad local	115
3.2.4.	Variables histopatológicas	115

	10
3.2.4.1. Diagnóstico histopatológico	116
3.2.4.2. Perfil inmunohistoquímico	116
3.2.4.3. Índices de proliferación tumoral	116
3.3. Técnica experimental	117
3.3.1. Preparación de las muestras para los estudios ex-vivo	117
3.3.2. Instrumentación y secuencias de adquisición HR-MAS	117
3.4. Método estadístico	121
4. Resultados	123
5. Discusión	147
5.1. Descripción del perfil metabólico	153
5.2. Análisis chemométrico global mediante PCA y PLS-DA	159
5.2.1. Modelo análisis de componentes principales	159
5.2.2. Modelo proyección de estructuras latentes de análisis discriminante	160
5.3. Curvas ROC y metabolitos diferenciadores	163
5.4. Adenomas hipofisarios atípicos	165
5.5. Casos especiales	169
5.5.1. Muestras localizadas en la gráfica PLS-DA, en regiones diferentes a las que corresponderían a su diagnóstico clínico	170
5.5.2. Muestras para las que el diagnóstico histopatológico no fue de adenoma hipofisario	176
5.6. Señal de ácidos grasos o lípidos	181
5.7. Prolactinomas	183

	11
5.8. Comparación MALDI-Tof	187
6. Conclusiones	191
7. Bibliografía	197



## LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS



1D: monodimensional.

2D: bidimensional.

Ala: alanina.

ACTH: hormona adenocorticotropa.

AIP: “aryl hydrocarbon receptor interacting protein”.

ADN ácido desoxirribonucleico.

cAMP: adenosín monofosfato cíclico.

ARN: ácido ribonucleico.

CDK: “cyclin dependent kinase”.

CH<sub>2</sub>: metileno.

CH<sub>3</sub>: metilo.

(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>: trimetilo.

CLU: cortisol libre urinario.

cm: centímetro.

Co (Cho): colina.

COSY: espectroscopia de correlación (“correlation spectroscopy”).

CPMG: secuencia Carr-Purcell-Meilboom-Gill.

Cr (Cre): creatina.

CRH: hormona liberadora de corticotropina.

CTE: cirugía transesfenoidal.

D<sub>2</sub>O: óxido de deuterio.

DA: dopamina.

DIPSI-2ESGPPH: secuencia específica de mezcla utilizada en la adquisición del experimento TOCSY.

DM: diabetes mellitus.

DRD: receptores de dopamina.

DSS: ácido 3,3 dimetil-2-2silapentano-5-sulfónico.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EM: esclerosis múltiple.

EM-RR: esclerosis múltiple remitente-recurrente.

ERM: espectroscopía por resonancia magnética nuclear.

ERMI: espectroscopía por resonancia magnética de imagen.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico.

FGFR: receptor del factor de crecimiento fibroblástico.

FID: decaimiento libre de la señal.

FIPA: adenoma hipofisario aislado familiar (“familial isolated pituitary adenomas”).

FSH: hormona folículo estimulante.

G: constante gravitacional.

GABA: ácido gamma-aminobutírico.

GARP: “globally optimized alternating-phase rectangular pulses”.

GH: hormona de crecimiento.

GHRH: somatocrinina.

Glc: glucosa.

Gln: glutamina.

Glu: glutamato.

Gly: glicina.

GNAS: “guanine nucleotide-activating alpha subunit gene”.

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas.

GPCo (GPCho): glicerofosfolina.

GSH: glutation.

GSPs: proteínas G estimuladoras.

Gy: unidades Gray.

h: horas.

H<sub>2</sub>O: agua.

HE: hematoxilina eosina.

HR-MAS: alta resolución con rotación al ángulo mágico (“high resolution-magnetic angle spinning”).

HSQC: secuencia de transferencia cuántica sencilla.

HSQCPHPR: programa de pulso específico, utilizado en la adquisición del experimento HSQC.

HTA: hipertensión arterial.

IGF-1: “insuline-like growth factor” o somatomedina C.

Ino: inositol.

IRM: imagen por resonancia magnética nuclear.

J<sub>ab</sub>: constante de acoplamiento.

kHz: kilohercios.

Lac: lactato.

LAR: long acting release.

LCR: líquido céfalo-raquídeo.

Leu: leucina.

LH: hormona luteinizante.

mI (Myo): mio inositol.

NCAM: molécula de adhesión celular neural.

MEN: neoplasia endocrina múltiple.

MGMT: metilguanina metil transferasa.

MHz: megahercios.

MM: macromoléculas.

Ms: milisegundo.

MSH: hormona estimuladora de los melanocitos.

NAA: N acetil aspartato.

NOESY: “nuclear Overhouser effect spectroscopy”.

p: probabilidad.

PCA: análisis de componentes principales.

PCo (PCho): fosfocolina.

PCr: fosfocreatina.

PCs: componentes principales.

PKA: proteína kinasa.

PLS-DA: análisis discriminante por proyección de estructuras latentes.

POMC: proopiomelanocortina.

ppm: partes por millón.

PRESAT: secuencia de pulso y adquisición con presaturación de señal del agua.

PRL: prolactina.

PRLR: receptores de prolactina.

PTTG: gen de transformación tumoral hipofisaria.

Rb: retinoblastoma.

RF: radiofrecuencia.

RHT: resistencia a hormona tiroidea.

RMN: resonancia magnética nuclear.

ROC: característica operativa del receptor.

RT: receptor de hormona tiroidea.

s: segundo.

SCSIE: servicio central de soporte a la investigación experimental.

SIAS: sistema integrado de ayuda asistencial.

SNC: sistema nervioso central.

SRAA: sustancia reticular activadora ascendente.

STOCSY: “statistical correlation spectroscopy”.

T1: tiempo de relajación longitudinal en RMN.

T2: tiempo de realajación transversal en RMN.

T<sub>3</sub>: triyodotironina.

T<sub>4</sub>: tiroxina libre.

TAC: tomografía axial computerizada.

Tau: taurina.

TF-RMN: transformada de Fourier de resonancia magnética nuclear.

TGF: “transforming growth factor”.

TMS: tetrametilsilano.

TMZ: temozolomida.

TRH: hormona liberadora de tiotropina.

TSH: hormona estimuladora del tiroides.

VEFG: factor de crecimiento endotelial vascular.

VOI: volumen de interés (“volume of interest”).

WHO: world health organization.

ZrO<sub>2</sub>: óxido de circonio.

δ: desplazamiento químico.

τ: intervalo entre pulsos.



## 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. METABOLÓMICA

En la segunda mitad del siglo XX, la investigación biomédica basada en la observación sistemática, en la experimentación y en la evidencia, evolucionó extraordinariamente, contribuyendo al mantenimiento de la salud y a una mayor esperanza de vida a través de la incorporación de nuevos conocimientos sobre la fisiopatología y diagnóstico de las enfermedades, al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y al desarrollo de nuevos fármacos y estrategias de tratamiento. Una de las ciencias que más se han relacionado con la medicina es la química que, aplicada a este campo de la investigación científica, se denomina química médica.<sup>1</sup>

La secuenciación masiva del ácido desoxirribonucleico (ADN), los avances de la bioinformática y las técnicas cada vez más sofisticadas para analizar genomas completos, han dado entrada a la era de las denominadas ciencias "ómicas".<sup>1</sup> El sufijo "-oma" tiene un origen latino, que significa "conjunto de", haciendo referencia a una nueva mentalidad en la que se desarrolla una visión global de los procesos biológicos. Las ciencias "ómicas" en su conjunto, tienen como objetivo el obtener la información necesaria para crear una nueva herramienta que permita diagnosticar y tratar enfermedades con mayor antelación y precisión. Esta nueva aproximación ha llevado al desarrollo de la que se conoce como medicina personalizada.<sup>2,3</sup>

La primera de ellas es la genómica, que surgió como la rama de la biología encargada del estudio del genoma, esto es, a la caracterización y localización de las secuencias que conforman el ADN, permitiendo la obtención de mapas genéticos de los organismos. Para dar respuesta a preguntas que están más allá de los estudios genómicos se ha desarrollado lo que se conoce como "post-genómica". Dentro de esta categoría se puede incluir la genómica comparativa, la genómica funcional, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica.<sup>1</sup> La genómica funcional es la disciplina que se orienta hacia la recolección sistemática de información acerca de las funciones desempeñadas por los genes, para lo que se requiere la información procedente de la genómica estructural. La transcriptómica estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de ácido ribonucleico (ARN) mensajero presentes en una célula, tejido u organismo y que corresponden a los genes que se están expresando.<sup>4</sup> La proteómica puede definirse como el equivalente a la

genómica funcional a nivel de las proteínas. Es por tanto la ciencia que estudia el proteoma o conjunto completo de proteínas que se pueden obtener de un genoma, correlacionándolas con los genes que les dan lugar.<sup>5</sup> La metabolómica estudia el metaboloma o conjunto de los metabolitos que producen los seres vivos.<sup>6,7</sup>

En paralelo al desarrollo del conocimiento en este campo de la biomedicina, también los costes de su aplicación (por ejemplo la secuenciación genómica de un individuo) están bajando progresivamente, por lo que en el transcurso de pocos años, previsiblemente podremos contar con las herramientas necesarias para que una persona pueda conocer su predisposición frente a las enfermedades monogénicas más comunes. En una medicina estandarizada se trata la enfermedad y no al paciente. En una medicina segmentada se diagnostica a grupos de pacientes, a los que se aplicará un protocolo de tratamiento específico. En un futuro relativamente próximo se podría llegar a una medicina personalizada o individualizada, en la que se podrá diagnosticar anticipadamente la predisposición a contraer una enfermedad en un momento determinado de la vida de una persona y, en consecuencia, adoptar las medidas terapéuticas idóneas y adaptadas a las condiciones individuales de cada paciente.<sup>2,3</sup>

Para ello es necesaria la identificación de biomarcadores. Un biomarcador es una característica bioquímica que se puede medir objetivamente y que se utiliza, fundamentalmente, para detectar una enfermedad (marcador diagnóstico), seguir su evolución (marcador pronóstico) o elegir un tratamiento (marcador predictivo) y monitorizarlo.<sup>8</sup>

Por este motivo actualmente, la identificación de biomarcadores se sitúa con claridad como una prioridad no solo en la investigación biomédica y en la agenda principal de las autoridades regulatorias, sino también desde el punto de vista industrial. Así, los biomarcadores se han convertido en una parte esencial del desarrollo clínico, porque potencialmente ofrecen un camino más rápido al mercado, en contraste con el enfoque tradicional para el desarrollo de métodos diagnósticos y/o terapéuticos.<sup>8</sup>

### 1.1.1. CONCEPTO

El metabolismo es el conjunto de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula o un organismo. Cada una de estas transformaciones constituye una ruta metabólica.

Los metabolitos son moléculas de bajo peso molecular que aparecen como intermediarias en una ruta metabólica, esto es, el conjunto de reacciones químicas catalizadas enzimáticamente, a través de las cuales un precursor se transforma en un producto metabólico. La presencia o ausencia de determinados metabolitos o su concentración absoluta o relativa puede ser un marcador de estados de enfermedad o de predisposición a ella. El número de metabolitos presentes en un ser vivo se estima aproximadamente entre 3000 y 20000.<sup>9-12</sup>

La metabolómica es la ciencia que estudia los metabolitos presentes en un sistema biológico.<sup>6,7</sup>

## 1.1.2. APROXIMACIONES EN METABOLÓMICA

### 1.1.2.1. MEDIDA DE LA HUELLA METABÓLICA

Es la primera aproximación en metabolómica. Tiene la finalidad de identificar los diferentes metabolitos que intervienen en el proceso biológico que es motivo del estudio.<sup>8-14</sup>

Consiste en la obtención de un espectro de picos mediante resonancia magnética nuclear y/o un espectro de masas atómicas medido por espectrometría de masas.<sup>13</sup>

Para ello se obtienen y se comparan los espectros de distintas muestras, aplicando métodos de reconocimiento de patrones, sin necesidad de conocer a priori los metabolitos involucrados. De este modo se puede determinar si existe alguna pauta de agrupación de muestras que nos permita, por ejemplo para una determinada patología, separar individuos sanos de enfermos, definir grupos y subgrupos, identificar factores de riesgo, etc.<sup>6, 13, 14</sup>

### 1.1.2.2. PERFIL METABOLÓMICO

Consiste en seleccionar, a partir de los datos de la huella metabolómica de un conjunto de muestras, cuales son los metabolitos que pudieran ser relevantes. El objetivo inicial es su identificación. En una segunda fase, particularizando el tratamiento de las muestras y utilizando diferentes técnicas de medida, se puede conseguir cuantificarlos.<sup>13</sup>

Si se consigue identificar y cuantificar uno o más metabolitos relevantes para un determinado tipo de muestra, habremos conseguido identificar los biomarcadores que intervienen en el proceso biológico motivo de estudio.<sup>13</sup>

### 1.1.3. APLICACIONES DE LA METABOLÓMICA

La utilidad principal de la metabolómica se relacionaría con el desarrollo de la investigación traslacional y, en último caso de la medicina personalizada.<sup>2-4</sup>

La investigación traslacional persigue diseñar rápidamente y estudiar cuanto antes nuevas aproximaciones diagnósticas o terapéuticas basadas en los últimos avances de la ciencia básica, con el fin de que estos repercutan sobre la salud humana a la mayor brevedad posible. El objetivo es aplicar con eficiencia el conocimiento de los procesos celulares, moleculares, fisiológicos, químicos o genéticos a la búsqueda de tratamientos eficaces o de técnicas de prevención o diagnóstico.<sup>2-4</sup>

Son numerosos los campos de investigación biomédica en los que se ha aplicado la metabolómica.<sup>14-18</sup>

- a) Desarrollo de nuevos fármacos
  - i) Detección y selección de nuevas sustancias activas.
  - ii) Medida de los cambios metabólicos generados por estas sustancias en modelos animales y/o humanos.
  - iii) Medida de la toxicidad de una sustancia.
  - iv) Comprobación del efecto de una sustancia sobre la salud de determinadas poblaciones.

- b) Monitorización de intervenciones nutricionales: estudio y medida de los cambios producidos sobre determinados grupos de metabolitos, tras la aplicación de una determinada dieta o ingesta de algún tipo de alimento.
- c) Monitorización y control evolutivo de la posible aparición de fenómenos de rechazo tras la realización de un trasplante de órganos.
- d) Detección de factores de riesgo para el desarrollo de determinadas enfermedades en una población.
- e) Diagnóstico y estratificación de enfermedades (metabólicas, degenerativas, tumorales, etc), a través de la identificación de biomarcadores.

#### 1.1.4. FASES DEL EXPERIMENTO METABOLÓMICO

##### 1.1.4.1. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

En primer lugar es preciso definir el tipo y el número de muestras a incluir en el estudio, así como el método de análisis de las mismas.<sup>14, 19-23</sup>

##### 1.1.4.2. MEDIDAS ANALÍTICAS

La espectroscopia por resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas, son las técnicas habitualmente utilizadas en experimentación metabolómica.<sup>24</sup>

La espectroscopia por resonancia magnética nuclear es una técnica versátil que permite efectuar mediciones de un gran número de metabolitos de forma fiable y repetitiva. El proceso de acondicionamiento de las muestras es sencillo y su nivel de automatización muy alto.<sup>24-27</sup>

Las técnicas de cromatografía (líquida o de gases) acoplada a espectrometría de masas, permiten analizar una gran cantidad de metabolitos a sensibilidades muy superiores a las de la espectroscopia por resonancia magnética. Aunque, mediante la

utilización de un método de separación adecuado, se consigue una gran selectividad, existen problemas metodológicos que hacen su utilización más dificultosa.<sup>27</sup>

#### 1.1.4.3. PROCESADO DE SEÑAL

La primera fase del proceso o pre-procesado de señal, tiene como objetivo el reducir la dimensión de la información básica obtenida del estudio de los espectros de las muestras. El número de las muestras (habitualmente elevado) y los miles de variables disponibles para cada una de ellas, hacen necesario generar unas nuevas dimensiones, escogiendo las direcciones de máxima varianza de los datos, a través del proceso denominado análisis de componentes principales (principal component analysis: PCA).<sup>19-21</sup>

Los diagramas de scores (medias) de un análisis PCA permiten observar cómo se agrupan las muestras en función de la similitud de su espectro de resonancia magnética, o lo que es lo mismo, de su metaboloma.

Los diagramas de “loading” (cargas) de un análisis PCA indican, por el contrario, cuales son las variables responsables de su separación.

La técnica PCA es no supervisada, lo que implica que el modelo matemático se construye sin la necesidad de tener información previa acerca de las muestras.<sup>20, 21</sup>

La utilización de métodos estadísticos COSY (correlation spectroscopy) y/o STOCSY (statistical total correlation spectroscopy) permite identificar correlaciones entre los diferentes metabolitos del espectro de las muestras.<sup>22, 23</sup>

#### 1.1.4.4. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES

La identificación de un metabolito precisa que su respuesta dentro del espectro esté separada de la de los restantes o bien de que podamos deconvolucionar su señal. La respuesta experimental obtenida se compara con las de bases de datos de metabolitos y, en caso de coincidencia, se puede considerar identificado como biomarcador. En casos de duda se recurre a la comprobación a partir de medidas comparadas con estándares.

Tras la identificación, en algunos casos también es posible cuantificar el marcador <sup>19, 23, 24</sup>.

Como paso final, una vez obtenido el conjunto de datos metabolómicos, hay que valorarlos siguiendo el método científico, para obtener conclusiones que puedan generar un valor añadido desde el punto de vista de la investigación biomédica.<sup>2, 7, 14</sup>



## 1.2. ESPECTROSCOPIA DE RMN

Tras el descubrimiento de la resonancia magnética nuclear (RMN) en 1946, el hallazgo de los desplazamientos químicos en la década de los 50, la convirtió en una poderosa herramienta para el estudio de la estructura molecular.<sup>28, 29</sup>

### 1.2.1. FUNDAMENTOS FÍSICOS DE LA RMN

#### 1.2.1.1. MAGNETISMO NUCLEAR

Los núcleos susceptibles de ser analizados mediante la técnica de RMN, son aquellos que tienen un número másico impar (suma de protones y neutrones). Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, ya que los núcleos poseen carga positiva y realizan un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. Entre los núcleos biológicamente relevantes que cumplen esta condición se encuentran los de los átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{23}\text{Na}$  y  $^{31}\text{P}$ . De ellos, los más ampliamente estudiados son el  $^1\text{H}$  y el  $^{13}\text{P}$ .

Por el contrario, los núcleos con un número másico par no tienen actividad magnética y no son activos en RMN. Entre ellos se cuentan los isótopos más abundantes del carbono y oxígeno ( $^{12}\text{C}$  y  $^{16}\text{O}$ ), por lo que para obtener su espectro de RMN es necesario utilizar aquellos de sus isótopos que posean un número másico impar, como el  $^{13}\text{C}$  o el  $^{17}\text{O}$ .<sup>28, 29</sup>

#### 1.2.1.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín  $\alpha$ , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín  $\beta$ . La diferencia de energía entre los dos estados de espín  $\alpha$  y  $\beta$ , depende de la fuerza del campo magnético aplicado  $H_0$ . Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín. La

diferencia de población entre núcleos en ambos estados, aunque es muy pequeña, es suficiente para provocar una magnetización macroscópica de la muestra. La resonancia magnética nuclear consiste en la detección de las modificaciones de esta magnetización

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín  $\alpha$  son promovidos al estado de espín  $\beta$ . Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (rf) del espectro electromagnético por eso se le denomina “radiación rf”. Cuando cesa el pulso los núcleos vuelven a su estado inicial emitiendo señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía ( $\Delta E$ ) entre los estados de espín  $\alpha$  y  $\beta$ . El término resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con la radiofrecuencia o la radiación rf, lo que supone que pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación a la que son sometidos. A esta frecuencia de señal de la RM se le denomina frecuencia de Larmor, depende específicamente del núcleo estudiado y es proporcional a la magnitud del campo magnético externo  $B_0$ .

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

En esta ecuación  $\omega_0$  es la frecuencia de resonancia y  $\gamma$  es la denominada constante giromagnética, que es específica para cada especie nuclear. Su valor para el  $^1\text{H}$  es de  $2.675 \times 10^8 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$ .<sup>28, 29</sup>

### 1.2.1.3. DESPLAZAMIENTO QUÍMICO

Hasta ahora se ha descrito el concepto de resonancia de un núcleo aislado dentro de un campo magnético, pero en realidad los núcleos, como pueden ser los protones o los de carbono que forman las moléculas orgánicas, no se encuentran aislados sino que están rodeados de electrones que los protegen parcialmente del campo magnético externo al que se ven sometidos.

En cualquier molécula, la nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera otra pequeña corriente inducida que se le opone. El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que

el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Este apantallamiento es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo ( $H_{ef}$ ) que recibe un protón dentro de una molécula es siempre menor que el campo externo ( $H_0$ ), y por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser mayor.

$$H_{ef} = H_0 - H_{loc}$$

Si todos los protones ( $^1H$ ) de una molécula orgánica estuvieran apantallados de igual forma, todos entrarían en resonancia con la misma combinación de frecuencia y campo magnético. Sin embargo, los protones se hallan dentro de entornos electrónicos diferentes, por lo que se encuentran diferentemente protegidos o apantallados, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Así pues, un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal, en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra.

Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos y se miden en unidades  $\delta$  o partes por millón (ppm).

En la práctica es difícil medir el campo magnético al que un protón absorbe, como para distinguir protones individuales, ya que la variación de sus absorciones es muy pequeña. Un método más exacto para conseguirlo y así expresar desplazamientos químicos, es determinar el valor respecto a un compuesto de referencia que se añade a la muestra.

El compuesto de referencia más común en RMN es el tetrametilsilano (TMS:  $(CH_3)_4Si$ ). Como el silicio es menos electronegativo que el carbono, los grupos metilo del TMS son relativamente ricos en electrones, es decir, sus protones están fuertemente apantallados. Como consecuencia de este apantallamiento, estos protones absorben a una intensidad de campo mayor que el resto de protones enlazados al carbono o a otros elementos, de manera que casi todas las señales de resonancia magnética nuclear

aparecen a campos más bajos (hacia la izquierda de la señal del TMS). Además todos los protones del TMS absorben con el mismo desplazamiento químico dando una única absorción intensa.

La escala más común de desplazamiento químico es la escala  $\delta$  (delta), en la que la absorción del TMS se define como 0.00  $\delta$ . La mayor parte de los protones absorben a campos menores que el TMS, de modo que la escala  $\delta$  aumenta hacia los campos menores. La mayoría de las señales de protones ( $^1\text{H}$ ) varían entre 0 y 12  $\delta$ , mientras que las señales del  $^{13}\text{C}$  varían del 0 a 250  $\delta$ .<sup>27, 28, 30</sup>

### 1.2.2. ESPECTRÓMETRO DE RMN

El espectrómetro de RMN consta de cuatro partes:

- a) Un imán estable, con un controlador que produce un campo magnético preciso.
- b) Un transmisor de radiofrecuencias, capaz de emitir frecuencias precisas.
- c) Un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra.
- d) Un ordenador y un registrador para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN.

Para obtener un espectro de RMN, se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en medio mililitro de disolvente, en un tubo de vidrio largo que se sitúa dentro del campo magnético del aparato. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical.<sup>27, 28, 30</sup>

En los aparatos modernos el campo magnético se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación rf excita a todos los núcleos simultáneamente. Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias los protones individualmente absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín). A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial.<sup>30</sup>

Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN). Un espectro FT-RMN puede registrarse en 2 segundos utilizando menos de 5 mg de muestra.<sup>27, 28</sup>

### 1.2.3. ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$

#### 1.2.3.1. CURVA DE INTEGRACIÓN

La intensidad relativa de una señal en espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , es proporcional al número de protones que contribuyen a la señal. Se denomina curva de integración a la que se obtiene por superposición a las señales del espectro.<sup>27, 28, 30</sup>

#### 1.2.3.2. DESACOPLAMIENTO ESPÍN-ESPÍN

Un protón en un espectro de resonancia magnética nuclear está expuesto tanto al campo magnético externo como al inducido por los electrones que lo rodean y por otros protones presentes en su entorno. Esto hace que el espectro de una molécula aparezca formado por varios picos o multipletes (según su número serían dobletes, triplete, cuadruplete, etc). Este desdoblamiento de la señal en multipletes se denomina desdoblamiento de espín y se origina cuando los espines magnéticos de dos tipos diferentes de protones interactúan (cuando se produce la interacción se dice que estos protones están acoplados magnéticamente).

El desdoblamiento espín-espín se explica teniendo en cuenta todos los espines individuales de los protones. La influencia sobre un protón, del campo magnético generado por el protón adyacente, afecta a la absorción de este. Así, cuando un protón,  $\text{H}_a$ , está alineado con el campo magnético externo, los protones adyacentes,  $\text{H}_b$ , se encuentran afectados por un campo magnético ligeramente más intenso, por lo que se ven desapantallados y absorben a un campo menor. Por el contrario, cuando la alineación del campo del protón  $\text{H}_a$  es opuesta a la del campo magnético externo, los protones adyacentes,  $\text{H}_b$ , se encuentran apantallados o protegidos y, en consecuencia, absorben a un campo más alto. La consecuencia en un caso como el de este ejemplo es que los protones  $\text{H}_b$  presentan dos absorciones, dando lugar a dos señales que forman el

doblete de su espectro. Por otra parte, el desdoblamiento de espín es una propiedad recíproca, por lo que si un protón desdobla a otro de su entorno, este debe desdoblar al primero. En consecuencia, en el ejemplo expuesto, el protón  $H_a$  generaría una señal en multiplete y su número sería proporcional al número de protones del entorno con los que se acopla. La multiplicidad o número de picos de una señal, viene dada por la regla  $N+1$ , donde  $N$  es el número de protones equivalentes que desdoblan una señal.<sup>27, 28, 30</sup>

#### 1.2.3.3. CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO

A la distancia entre picos de multipletes, medidas en Herzios, se les denomina constantes de acoplamiento entre los protones magnéticamente acoplados y dan información estructural. Se simboliza como  $J_{ab}$ , donde  $H_a$  y  $H_b$  son los protones acoplados entre sí.<sup>27, 28, 30</sup>

#### 1.2.4. RMN DE SÓLIDOS. LA RMN CON GIRO AL ÁNGULO MÁGICO

Durante la década de los 60, la RMN fue utilizada con éxito para el estudio espectroscópico de muestras líquidas y disoluciones, dado que para ellas el espectro convencional está formado por señales muy estrechas y bien definidas, que contienen la información molecular. Sin embargo, el estudio de muestras sólidas producía señales muy anchas (en el rango de kHz o incluso MHz), lo que dificultaba la obtención de información acerca de su composición química. Por este motivo inicialmente se hacía necesario disolverlas o fundirlas previamente, para poder trabajar con ellas.

La diferencia de comportamiento de las muestras líquidas y sólidas proviene de la diferente movilidad de las moléculas en ambos estados. En estado líquido, las moléculas se reorientan muy rápidamente al ser sometidas al campo magnético, promediando las interacciones anisótropas entre ellas, lo que no ocurre con las muestras sólidas. En consecuencia, la obtención de espectros de alta resolución para muestras en estado sólido, necesita de la aplicación de técnicas especiales.<sup>27, 28, 30</sup>

La rotación macroscópica de la muestra fue la idea base que incorporaron Andrew<sup>31</sup> (1958) y Lowe<sup>32</sup> (1959), para suplir la insuficiencia de movimiento molecular de sólidos y así poder obtener espectros de alta resolución de muestras en este estado.

Estos autores demostraron que si una muestra sólida se gira a una velocidad suficiente alrededor de un eje que forma un ángulo de  $54^{\circ}7'$  con respecto a la dirección principal del campo magnético externo, el ensanchamiento dipolar se promedia y es posible la obtención de espectros de alta resolución. Denominaron a este ángulo el “ángulo mágico” y al giro de la muestra “magic angle spinning” (MAS) o “giro al ángulo mágico”.<sup>33</sup>

Las dificultades técnicas para lograr este giro al ángulo mágico se resolvieron en la década de los 70 y fue a partir de entonces cuando se inició su aplicación al estudio de la estructura molecular de sólidos. En los últimos años los avances en informática, electrónica de equipos y la construcción de imanes más potentes, han impulsado aun más el desarrollo de nuevos experimentos en el campo de la RMN de sólidos, lo que ha permitido la realización de estudios de espectroscopía por RMN (ERM) sobre muestras intactas de tejidos biológicos.<sup>34, 35</sup>



### 1.3. ERM $^1\text{H}$ EN EL ESTUDIO DEL SNC

La ERM de  $^1\text{H}$  es una técnica incruenta y no destructiva que emplea campos magnéticos de orden de magnitud de radiofrecuencia que penetran bien en los objetos de estudio, por lo que permiten obtener medidas repetidas en seres vivos.<sup>27</sup> Aunque puede ser utilizada para el análisis de casi cualquier tipo de tejido, su aplicación al sistema nervioso central (SNC) es la que ha experimentado un mayor auge, en paralelo al gran desarrollo de las aplicaciones de imagen por RMN (IRM) al diagnóstico de neuroimagen.<sup>34-41</sup>

Existen tres técnicas fundamentales de estudio ERM: in-vivo, in-vitro y ex-vivo. La ERM in-vivo se obtiene aplicando un “software” específico en los estudios convencionales de RM. La técnica de ERM in-vitro consiste en el análisis de extractos de muestras de tejido disueltas en medio ácido y la técnica de ERM ex-vivo estudia el perfil metabólico de muestras tisulares intactas. Dado que la técnica ERM in-vivo no necesita disponer de muestras de tejido y está disponible en una gran parte de los equipos de RMN instalados en centros hospitalarios, es la que se ha utilizado con más frecuencia y ha sido aplicada a un mayor número de estudios sobre el SNC.<sup>34-55</sup>

#### 1.3.1. ERM $^1\text{H}$ in-vivo

Los estudios publicados se basan en la aplicación de la ERM in-vivo al estudio de las rutas metabólicas y sus estadios, tanto en el tejido normal de individuos sanos de diferentes edades, como en el contexto de diferentes enfermedades del SNC, como por ejemplo enfermedades neurodegenerativas, demencias, tumores, isquemia, epilepsia, encefalopatías metabólicas, esquizofrenia, etc.<sup>36-39, 46</sup>

La obtención de información útil acerca del metabolismo del tejido estudiado, hace necesario definir el origen del espectro y limitarse a la región anatómica de interés. La elección de la técnica a emplear con este fin depende de la zona anatómica estudiada y del nivel de detalle espectral que se precisa, intentando optimizar con ello la relación señal/ruido de los espectros generados. Si se selecciona la señal de un único voxel, se denomina técnica de volumen único (VOI: volume of interest). Si se procesa la señal global detectable por la bobina de RMN (señal “multi-vóxel”) con el fin de reconstruirla

y conseguir información relativa a la distribución espacial de los metabolitos, se denomina espectroscopia de resonancia magnética de imagen (ERMI).<sup>27, 28, 34, 38</sup>

En el campo de estudio de la información metabólica del tejido nervioso normal, se ha constatado la accesibilidad de la región de los pedúnculos cerebelosos y el tronco de encéfalo para la técnica ERMI. Esta es una región anatómica de gran densidad axonal, dado que a su través pasan las grandes vías ascendentes y descendentes que conectan la corteza cerebral con el resto del SNC. Consecuentemente, se trata de una región a priori idónea, para detectar trastornos metabólicos en la sustancia blanca aparentemente normal, que pudieran estar asociados a las alteraciones neuronales de patologías difusas del SNC.<sup>36</sup>

Estudios de ERMI en la región de los pedúnculos cerebrales y el tronco de encéfalo, realizados en pacientes afectos de esclerosis múltiple (EM), han puesto de manifiesto la existencia de degeneración walleriana en pacientes diagnosticados de EM remitente-recurrente en fases precoces de la enfermedad y la han relacionado con la actividad de la enfermedad y su tiempo de evolución (mayor afectación para pacientes con enfermedad activa durante un periodo de tiempo más largo). Otros estudios han relacionado la alteración cognitiva (disfunción atencional) que suele estar presente ya en fases precoces para pacientes con EM-RR, y que con frecuencia es infravalorada en las escalas de discapacidad utilizadas con fines de diagnóstico y pronóstico para la misma, con modificaciones metabólicas en localizaciones concretas en las que existen neuronas implicadas en el tránsito de la información (descenso de NAA/Cr en el locus ceruleus, estructura que forma parte de la SRAA del tronco de encéfalo). Dado que se trata de una técnica incruenta y repetible, también se ha utilizado para observar las variaciones bioquímicas que tienen lugar en la evolución del proceso desmielinizante, habiéndose constatado su existencia en placas de desmielinización de diferente cronología, en pacientes con EM-RR.<sup>36</sup>

En pacientes afectos de demencias (enfermedad de Alzheimer y demencia vascular), deterioro cognitivo leve y depresión, se han realizado análisis metabólicos de la sustancia gris de dos localizaciones, parietal posterior y lóbulo temporal derechos, comparándolos y encontrando diferencias entre los diagnosticados de demencia, respecto a los no diagnosticados de demencia. Las relaciones Co/Cr y ml/Cr en la

sustancia gris parietal posterior fue superior para los pacientes con demencia, mientras que el cociente NAA/mI fue inferior para ellos en esa misma localización con tiempo de eco corto. Los pacientes con enfermedad de Alzheimer y los diagnosticados respectivamente de depresión y deterioro cognitivo leve, presentan diferencias estadísticamente significativas en sus perfiles espectrales, que permiten orientar un diagnóstico molecular diferencial entre estas patologías. La disminución en el contenido de NAA se ha interpretado como un indicador de destrucción neuronal mientras que el incremento del contenido en mI se ha relacionado con la hiperosmolaridad secundaria al proceso inflamatorio, en la sustancia gris parietal posterior. Su estudio ha mostrado diferencias entre pacientes con diagnóstico de enfermedad de Alzheimer (superior cociente mI/Cr) y de demencia vascular (superior cociente NAA/mI). También se ha descrito la posible utilidad de la detección de un aumento significativo del cociente Co/Cr en la sustancia gris del lóbulo temporal dcho, en el diagnóstico diferencial entre ambas demencias (superior en la demencia vascular). Globalmente, las variables que parecen discriminar mejor el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer con el resto de entidades diagnósticas, son los cocientes mI/Cr y NAA/mI, sin que se haya encontrado una diferencia significativas entre ellas con relación a su sensibilidad y especificidad.<sup>37,</sup>

39

La investigación sobre tumores cerebrales es un campo de particular interés, debido a su trascendencia desde un punto de vista tanto individual como social, por su frecuencia y por su capacidad de producir grave deterioro e incapacidad o, en algunos casos la muerte del paciente, a pesar de la utilización de complejas terapias combinadas. Los tumores astrocitarios constituyen el tipo más frecuente entre las neoplasias cerebrales y dentro de ellos existen diferentes subtipos caracterizados por su diferente comportamiento biológico o grado de malignidad, de lo que se derivan importantes implicaciones de tipo diagnóstico, pronóstico y terapéutico. Se han desarrollado estudios de ERM in-vivo, en los que se han descrito las características metabólicas de los astrocitomas cerebrales y otros tumores intracraneales. Es destacable la importancia de las macromoléculas y el mI en la diferenciación entre diferentes tipos de gliomas. Estas macromoléculas consisten en dos bandas anchas distintas, compuestas por lípidos relacionados con la presencia de necrosis tisular (MMB), presentes en tumores de alto grado de malignidad y otra relacionada con la presencia de polipéptidos y aminoácidos (MMA), más presente en tumores de grado bajo e intermedio de malignidad. Los

resultados de estos trabajos han llevado a proponer una clasificación/gradación de tumores gliales, basada en sus patrones metabólicos estudiados mediante ERM. Incluso se ha planteado la posibilidad de que en base al desarrollo de estas técnicas incruentas, pueda plantearse en el futuro la posibilidad de prescindir del estudio histológico de tumores cerebrales, evitando la realización de una biopsia con sus riesgos inherentes y basando el diagnóstico y las pautas de manejo derivadas, exclusivamente en los resultados de estudios metabólicos por ERM *in-vivo*.<sup>40-42</sup>

### 1.3.2. ERM $^1\text{H}$ *in-vitro*

La ERM *in-vitro* consiste en la obtención de los espectros para las disoluciones de extractos en medio ácido, de biopsias de tejido cerebral. Con respecto a los estudios *in vivo*, cuenta con la ventaja de que permite emplear campos magnéticos de mayor intensidad, lo que mejora la sensibilidad y resolución de la técnica y hace más sencilla la determinación cuantitativa de los metabolitos identificados en los espectros.

Los primeros trabajos en los que se utilizó en sistema nervioso, datan de la década de 1990. En ellos se investigaron las características espectrales de extractos de cerebro y diferentes tipos de tumores cerebrales, obtenidos durante cirugías intracraneales. Como resultado, se describieron los patrones espectroscópicos de tejido cerebral normal, gliomas de bajo y alto grado, meningiomas, oligodendrogliomas, meduloblastomas y otras lesiones tumorales del cerebro.<sup>43, 44</sup>

En 1998, Pascual y cols, publicaron un trabajo en que se determinaron ocho cocientes de intensidad: Cho/Cre, Cho/NAA, Cho/Ino, Cre/NAA, Gln/Glu, Tau/NSS, Ala/NAA y Ala/Cre. En base a la comparación de estos cocientes, obtenidos de espectros de tejido normal y diferentes tipos tumorales, plantearon la posibilidad de realizar un diagnóstico diferencial de los mismos.<sup>45</sup>

### 1.3.3 ERM $^1\text{H}$ *ex-vivo*

Los estudios de ERM *ex-vivo* de alta resolución con rotación al ángulo mágico (HR-MAS), se han utilizado para analizar muestras de tejido intacto obtenido mediante biopsia o resección quirúrgica de diferentes tipos de tumores cerebrales.<sup>35, 38, 40, 48-55</sup> Sus

resultados se han correlacionado con los de estudios in-vivo e in-vitro, así como con los de estudios histopatológicos realizados sobre las mismas lesiones, validándolos.<sup>46</sup> Como consecuencia, se han identificado y cuantificado metabolitos a una resolución espectral mucho mayor que la actualmente disponible para estudios de ERM in-vivo, permitiendo conocer cuáles son los metabolitos potencialmente “visibles” mediante RMN, que pudieran ser identificados como biomarcadores y ser valorados por técnicas in-vivo en el futuro.<sup>47, 48</sup>

En un estudio de ERM ex-vivo realizado sobre muestras intactas de glioblastomas multiformes (astrocitomas grado IV de la OMS) con espectros mono y bidimensionales de correlación homo y heteronuclear, se asignaron los desplazamientos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de 129 resonancias diferentes, pertenecientes a 37 metabolitos distintos.<sup>40</sup> Estos hallazgos se correlacionaron con los resultados del estudio de los mismos casos mediante ERM in-vivo y de extractos del tejido mediante RMN in-vitro. En el estudio HR-MAS se detectaron, además de los metabolitos previamente encontrados in-vivo, otras moléculas (hasta 18 aminoácidos y fragmentos de ácidos grasos hasta 8 carbonos de longitud). La obtención intensiva de metabolitos llevó a identificar tendencias, consideradas preliminares, en la diferenciación entre dos subtipos de glioblastomas, primarios (desarrollados de novo) y secundarios (representando la malignización de un astrocitoma preexistente de menor grado), con diferente pronóstico y por tanto con una potencial utilidad clínica relacionada con el tratamiento de estas lesiones.<sup>40</sup> Otros trabajos publicados han llevado a similares conclusiones.<sup>49-52</sup>

Tugnoli et al, realizaron un interesante estudio, describiendo de modo exhaustivo el perfil metabólico de 6 meningiomas, utilizando la técnica de ERM HR-MAS ex-vivo.<sup>53</sup> La inspección directa de espectros monodimensionales de ERM de protones, permitió la identificación numerosos metabolitos mientras que la detección de otros, como GSH o HTau, presentes en menor concentración y ocultos por la señal de los más abundantes, fue posible mediante la obtención de espectros 2 D (COSY, TOCSY y HSQC). Entre los metabolitos de bajo peso molecular que se identificaron como componentes principales de los meningiomas, destacan Glu+Gln (GLx), Cho libre, ChoCC, Ala, Gly y Tau. La concentración de Cr fue baja (con un elevado índice Cho/Cr) y fue especialmente característica la ausencia de NAA, lo que se relaciona con el origen extracerebral de estos tumores. Las diferencias más significativas entre las

muestras estudiadas, estaban relacionadas con la detección de lípidos y macromoléculas en los diferentes subtipos lesionales (por ejemplo fosfolípidos, triglicéridos o colesterol). Con relación a la detección de polioles, se describe la presencia de manitol en todas las muestras analizadas (había sido utilizado como tratamiento preoperatorio en todos los casos), señales de  $\alpha$  y  $\beta$ -Glc, así como Myo y scillo-inositol. Para estos pacientes se realizó también una comparación entre los datos del estudio metabólico ex-vivo y el perfil obtenido mediante estudio in vivo de los mismos tumores, describiéndose una buena correlación entre ambos grupos de datos. Los autores concluyeron que los resultados del estudio ex-vivo de estas neoplasias, permitían una mejor comprensión e interpretación de los espectros ex vivo previamente descritos y que incluso podía existir la posibilidad de diferenciar los diferentes subtipos histológicos de meningiomas estudiados, en base a su perfil metabólico.<sup>53</sup>

También se han correlacionado los hallazgos de estudios metabólicos ex-vivo e in-vivo, con datos clínicos acerca del comportamiento biológico de los meningiomas. Se ha descrito que las concentraciones absolutas de alanina y creatinina, están disminuidas en los meningiomas de bajo, con respecto a los de alto grado. A su vez, las concentraciones de alanina y el cociente glicina/alanina, permitían diferenciar entre meningiomas primarios y recurrentes y las concentraciones de alanina y creatina, junto con los cocientes glicina/alanina y colina/glutamato, se asociaban a la precocidad de la recurrencia tumoral.<sup>53, 54</sup>

## 1.4. BASES DE ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA HIPÓFISIS

### 1.4.1. ANATOMÍA HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIA

La glándula hipófisis es un cuerpo ovoide, de tamaño aproximado de 10x10x5 mm, que se continúa con el infundíbulo (prolongación caudal cónica y hueca del túber cinereum del hipotálamo). Su peso medio es de 500 a 600 mg (100 mg en el momento del nacimiento). La glándula es aproximadamente un 20% más voluminosa en la mujer y su tamaño se incrementa (entre un 20 y un 100%) durante el embarazo y disminuye progresivamente durante el envejecimiento.<sup>56, 57</sup>

Se encuentra ubicada en la base del cráneo, en una depresión del hueso esfenoides que recibe el nombre de silla turca, limitada lateralmente por los senos cavernosos y separada del espacio intracraneal por el diafragma selar.<sup>56, 57</sup>

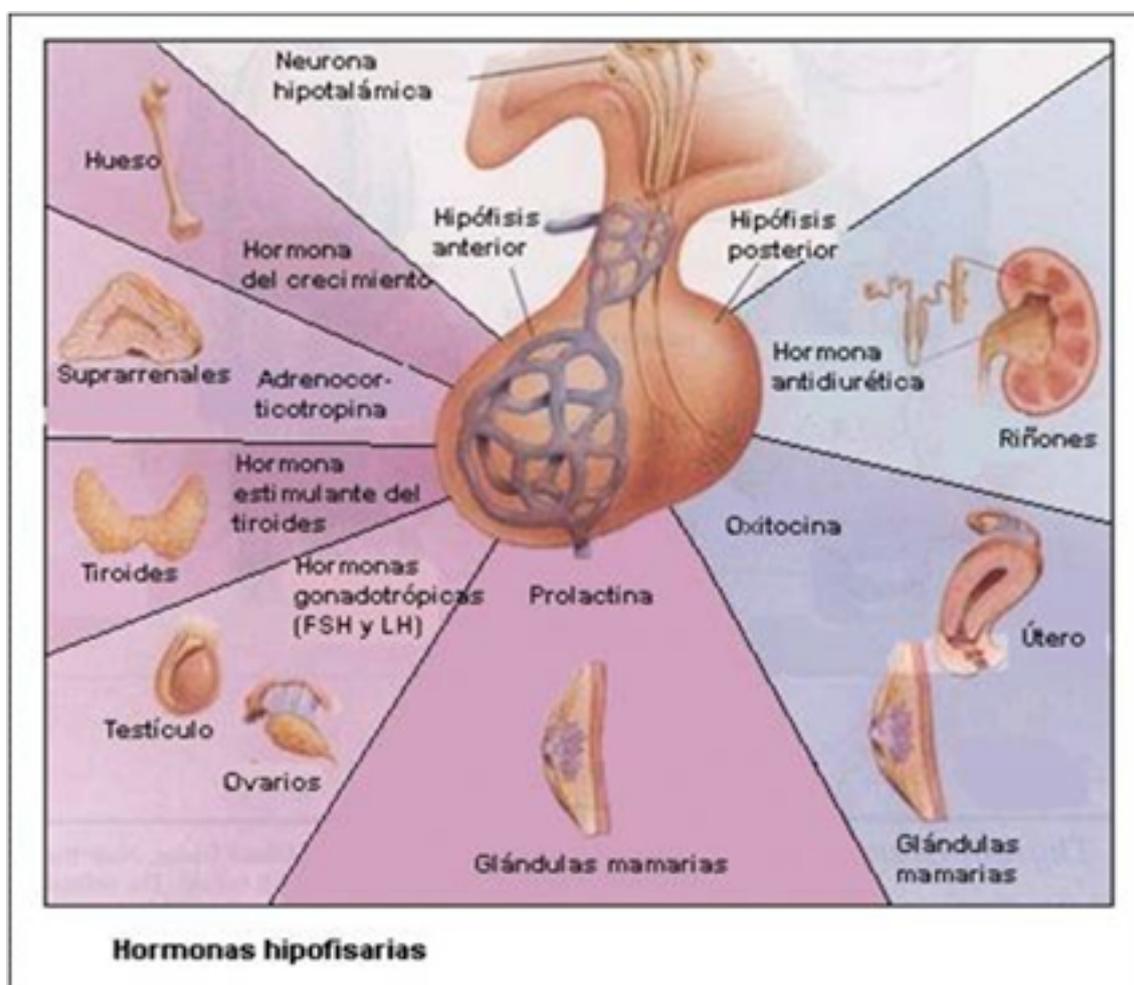
La glándula tiene dos partes diferenciadas: hipófisis anterior o adenohipófisis e hipófisis posterior o neurohipófisis. La adenohipófisis está integrada por diferentes poblaciones de células que conforman un tejido de tipo epitelial secretor y, entre ellas, hay fibras reticulares de sostén y capilares con amplias fenestraciones. La neurohipófisis está formada por las terminaciones de los axones de neuronas localizadas en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo.<sup>56-57</sup>

### 1.4.2. FUNCIÓN HIPOFISARIA

El eje hipotálamo-hipofisario es el responsable de la regulación del sistema endocrino. Organiza las respuestas hormonales apropiadas a estímulos provenientes de centros neurológicos superiores. Desde el punto de vista fisiológico, el hipotálamo tiene parte del control de la secreción de las hormonas de la adenohipófisis y es el responsable de la producción de las hormonas neurohipofisarias. Las hormonas liberadas por la adenohipófisis estimulan la producción de hormonas por parte de los órganos endocrinos periféricos (gónadas, glándulas suprarrenales, tiroides, etc). La hipófisis también ejerce un mecanismo regulador sobre el hipotálamo y, a su vez, ambos son controlados por las hormonas de los órganos diana, a través de un sistema de “feed-back” negativo.<sup>57, 60</sup>

Las seis principales hormonas producidas por la hipófisis anterior son: PRL (prolactina), GH (hormona de crecimiento), ACTH (hormona adrenocórticotropa o estimuladora de la glándula suprarrenal) y las hormonas glicoprotéicas que corresponden a LH (hormona luteinizante), FSH (hormona folículo-estimulante) y TSH (hormona tirotrópica o estimuladora del tiroides).<sup>60</sup>

En la neurohipófisis se liberan dos hormonas que son producidas por los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo: desmopresina (también llamada vasopresina y hormona antidiurética) y oxitocina.<sup>60</sup>



**Figura 1.-** Función hipofisaria. Producción y liberación de hormonas hipofisarias por la hipófisis anterior o adenohipófisis (en color rosa en la figura) y la hipófisis posterior o neurohipófisis (en color azul en la figura). Rodríguez-Barceló S. (2016). Funciones de la hipófisis. [Figura]. Recuperado de <http://rodriguezbarcelo.es>

### 1.4.3. HORMONAS HIPOFISARIAS

- a) PROLACTINA (PRL): se trata de un polipéptido constituido por 198 aminoácidos que contiene tres puentes disulfuro. Presenta polimorfismo molecular y se han identificado tres tipos de prolactina circulante: nativa (23 kD), big-PRL (48-56 kD) y big-big-PRL (150-170 kD). De ellas la PRL nativa es la forma más bioactiva y supone entre un 80-90% del total de la PRL en individuos normales.<sup>58, 60</sup>
- b) HORMONA DE CRECIMIENTO O SOMATOTROPINA (GH): es un polipéptido de cadena única constituido por 191 aminoácidos y contiene dos puentes disulfuro. Presenta por tanto una similitud estructural con la PRL. Su estructura cristalina presenta cuatro hélices  $\alpha$ . En sangre periférica se identifican varias moléculas diferentes. De ellas, el monómero de 22 kD es la de mayor importancia fisiológica y representa aproximadamente el 75% de la secreción de GH.<sup>58, 60</sup>
- c) HORMONA ADRENOCORTICOTROPA (ACTH): polipéptido constituido por 39 aminoácidos. De ellos los 12 localizados en el extremo N-terminal son los que tienen actividad biológica. Su peso molecular de 4'5 kD.<sup>58, 60</sup>
- d) GLICOPROTEINAS ADENOHIPOFISARIAS (TSH, LH, FSH): se trata de un grupo de hormonas constituidas por dos subunidades codificadas por genes distintos. De ellas la subunidad  $\alpha$  está formada por 92 aminoácidos y es común para todas. La subunidad  $\beta$  es única para cada una de ellas y es la que le confiere especificidad de acción, al ser responsable de la interacción de la hormona con su receptor celular.<sup>58, 60</sup>
- e) HORMONA ESTIMULADORA DEL TIROIDES o TIROTROPINA (TSH): su subunidad  $\beta$  tiene 112 aminoácidos. Su peso molecular es de 28 kD.<sup>58, 60</sup>
- f) HORMONA LUTEINIZANTE (LH): su subunidad beta tiene 121 aminoácidos.<sup>58, 60</sup>

g) HORMONA FOLICULO-ESTIMULANTE (FSH): su unidad  $\beta$  tiene 111 aminoácidos.<sup>58, 60</sup>

## 1.5. ADENOMAS HIPOFISARIOS

### 1.5.1. EPIDEMIOLOGÍA

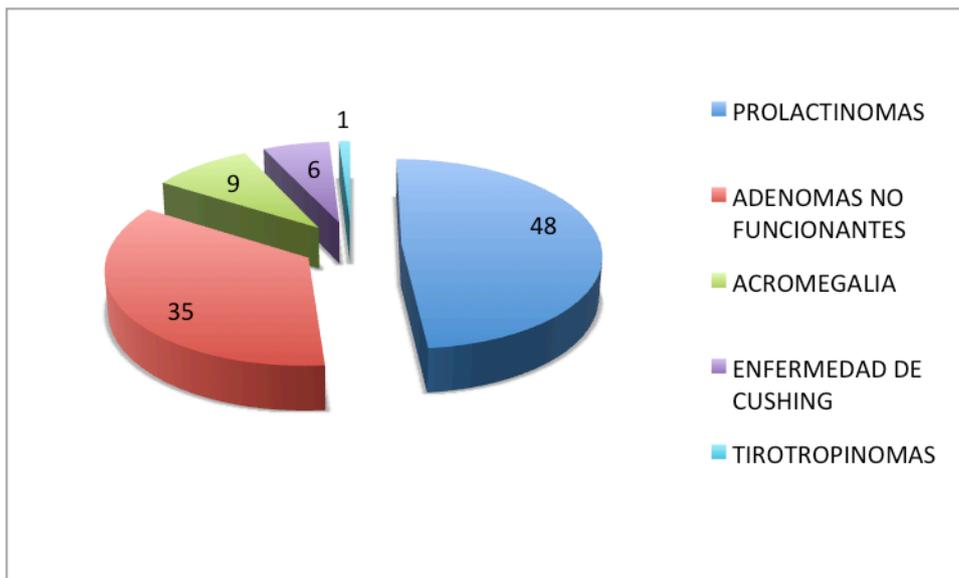
En 2004, Ezzat et al publicaron un metaanálisis en el que se estudiaba la prevalencia de los adenomas hipofisarios.<sup>61</sup> Para su realización se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de artículos en lengua inglesa en MEDLINE, utilizando los términos de búsqueda: "adenoma hipofisario", "tumor hipofisario" y "prevalencia". En base a estos criterios, se identificaron 33 artículos para su potencial inclusión en el estudio. Entre ellos fueron seleccionados aquellos en los que se describía la prevalencia de adenomas hipofisarios en base a técnicas de diagnóstico post-mortem o radiológicas, si incluían una descripción detallada la metodología adecuada para determinar la presencia de un adenoma hipofisario. Desde el punto de vista metodológico para los estudios realizados utilizando técnicas post-mortem, se consideró el espesor y espaciado de las muestras histopatológicas y, para los realizados utilizando técnicas radiológicas, la distancia entre cortes y las proyecciones (coronal, sagital o ambas) utilizadas. Se hizo especial hincapié a la hora de agrupar para el análisis aquellos que utilizaban técnicas similares. De este modo, 20 de los 33 artículos fueron rechazados para su evaluación debido a su diseño o a la utilización de una metodología poco detallada y solo 13 (cinco basados en datos radiológicos y 8 en datos de estudios post-mortem) fueron incluidos para la extracción y análisis de datos.<sup>62-74</sup> Tres clínicos con experiencia en el manejo de trastornos hipofisarios, revisaron los artículos seleccionados, utilizando una tabla de recogida específica para la extracción de datos. Se recogió la prevalencia de adenomas hipofisarios en cada uno de los estudios y también los parámetros que pudieran influir en la estimación de esta prevalencia (número de especímenes post-mortem o de estudios radiológicos examinados, número de tumores y metodología para determinar la prevalencia, etc). Los datos relativos a estos tres parámetros fueron analizados por separado para cada tipo de estudio. Posteriormente los revisores compararon sus datos y resolvieron por consenso las discordancias detectadas. Se incluyeron también los datos de inmunohistoquímica para PRL, GH, ACTH, LH, FSH y TSH.

El objetivo del estudio era el de integrar los datos extraídos de los artículos revisados y calcular, en base a ellos, la prevalencia de adenomas hipofisarios del modo más fiable posible. Para todos los estudios se extrajo el dato de prevalencia media y se

calculó la varianza media. Inicialmente se valoró la prevalencia estimada y el intervalo de confianza 95%, apreciándose que el espesor de la muestra tisular se correlacionaba inversamente con la estimación de prevalencia de adenomas hipofisarios. De este modo, un menor grosor de los cortes se asociaba con una mayor estimación de prevalencia de adenomas hipofisarios, independientemente de que se utilizasen técnicas de estudio histológicas o radiológicas. Por este motivo se consideró importante la valoración de estimación de prevalencia utilizando ambas metodologías. Para el análisis estadístico se utilizó la técnica de metaanálisis.<sup>75</sup>

El análisis inicial de datos estableció ya inicialmente un alto grado de correlación entre los diferentes revisores, indicativo de la exactitud de la información obtenida del análisis de los artículos. De los 13 estudios que se seleccionaron inicialmente, 3 fueron excluidos en esta fase. Uno de ellos por incluir una incidencia inusualmente alta de hiperplasia hipofisaria que hacía dudoso el criterio histológico de definición de adenomas y dos estudios radiológicos porque la técnica de imagen utilizada no se consideró suficientemente precisa para la detección de microadenomas,<sup>62, 64, 74</sup>.

Entre los 10 estudios (3 radiológicos y 7 post-mortem) finalmente incluidos en el metaanálisis, hubo una gran variabilidad en la estimación de prevalencia de adenomas hipofisarios: entre un 1 y 40% en los estudios radiológicos y entre un 1 y un 35% para los estudios post-mortem.<sup>61, 63, 65-73</sup> La estimación de prevalencia de adenomas hipofisarios entre todos los estudios post-mortem fue de un 14'4%, mientras que para los estudios radiológicos fue de un 22'5%. La estimación global de prevalencia para ambos grupos de estudios fue de un 16'7%. Estos datos indican que los adenomas hipofisarios son neoplasias frecuentes entre la población general. Muchos de ellos pasan desapercibidos y no llegan a ser diagnosticados durante la vida de un individuo, por lo que los estudios epidemiológicos dependientes del previo diagnóstico clínico, resultan de escasa utilidad.<sup>61</sup>



**Figura 2.-** Clasificación y frecuencia aproximada (porcentual) de aparición de los diferentes tipos de adenomas hipofisarios, desde el punto de vista clínico.<sup>57</sup>

### 1.5.2. PATOGENIA

Los estudios realizados, utilizando técnicas de inactivación del cromosoma X, han demostrado que los adenomas hipofisarios son, en su mayor parte, neoplasias con un patrón de proliferación monoclonal, derivados bien de células progenitoras o bien de células adenohipofisarias secretoras diferenciadas.<sup>76-79</sup>

Los mecanismos patogénicos que intervienen en el desarrollo de los adenomas hipofisarios son variados y complejos. Entre los más importantes se incluyen las alteraciones en la regulación hormonal y los receptores hormonales, la desregulación de los factores de crecimiento y la alteración de sus receptores, las anomalías en las proteínas que transducen la señal de estos estímulos y las alteraciones en la interrelación entre las células tumorales y el estroma.<sup>76, 78</sup> También en los últimos años se ha avanzado en la identificación de otros mecanismos, entre los que destacan la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores del desarrollo tumoral.<sup>77</sup>

#### 1.5.2.1. ALTERACIONES EN LA REGULACIÓN HORMONAL

El desarrollo de la adenohipófisis normal depende de influencias hormonales para la expansión de poblaciones celulares diferenciadas. Tanto el hipotálamo como las

glándulas endocrinas periféricas, producen hormonas que actúan sobre la hipófisis a través de mecanismos de retroalimentación interrelacionados que regulan su actividad, con la finalidad de mantener un equilibrio homeostático constante. Por este motivo se ha pensado que la estimulación hormonal y/o las alteraciones de los mecanismos de retroalimentación inhibitorios pueden ser importantes en la patogenia de los adenomas hipofisarios.<sup>76, 78</sup>

Los datos de que se dispone sugieren que, aunque la estimulación hormonal puede inducir proliferación celular, este mecanismo no estaría implicado en la transformación neoplásica que da lugar al desarrollo de los adenomas hipofisarios. Son ejemplos de ello la hiperplasia lactotropa o la tendencia al crecimiento de prolactinomas preexistentes en mujeres embarazadas causada por estimulación lactotropa durante el embarazo, la tendencia al desarrollo de una hiperplasia tirotrópica y lactotropa en pacientes afectados de hipotiroidismo primario por estímulo de TRH o la hiperplasia corticotropa y casos de síndrome de Cushing, en humanos afectados de tumores endocrinológicos que generan una producción ectópica de CRH.<sup>78</sup>

También la pérdida de los mecanismos fisiológicos de inhibición, puede relacionarse con una alteración del equilibrio hormonal con una potencial relación con la aparición de adenomas hipofisarios. Por ejemplo, la dopamina tiene un efecto inhibitorio sobre las células lactotropas y se ha descrito en prolactinomas el desarrollo de una red de neovascularización que supondría un “by-pass” al hipotálamo, dando lugar a una pérdida de la regulación hipotalámica que podría permitir a las células tumorales lactotropas escapar de la influencia inhibitoria de la DA. Así mismo, la somatostatina producida por el hipotálamo inhibe la secreción de GH y sus receptores se expresan en los adenomas hipofisarios somatotropos, habiéndose descrito una menor expresión de receptores de somatostatina en grandes adenomas somatotropos invasivos, con respecto al tejido hipofisario normal.<sup>78</sup>

#### 1.5.2.2. ALTERACIONES DE RECEPTORES HORMONALES

Los datos disponibles sugieren que una señalización anormal por parte de los receptores hormonales, podría contribuir a una respuesta disfuncional a los mecanismos de retroalimentación de tipo inhibitorio. Sin embargo, a excepción del subtipo

escasamente granulado de los adenomas somatotropos, no parece que las alteraciones de los receptores hormonales jueguen un papel importante en la etiopatogenia del resto de adenomas hipofisarios.<sup>76, 78</sup>

### 1.5.2.3. DESREGULACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y SUS RECEPTORES

La glándula hipófisis es el órgano de síntesis y también órgano diana para muchos factores que modulan la producción hormonal y regulan el crecimiento celular. Algunos factores de crecimiento tienen un papel primordial en el desarrollo hipofisario. Por estos motivos, las alteraciones en su expresión y/o funcionamiento, podrían tener un papel importante en el desarrollo de tumores hipofisarios.<sup>76, 78, 79</sup>

La familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y sus receptores se ha relacionado con la etiopatogenia de un gran número de neoplasias en humanos. La hipófisis expresa los ligandos TGF- $\alpha$  (“Transforming Growth Factor”) y EGF que alteran la producción hormonal e inducen la proliferación celular. TGF- $\alpha$  ha sido descrito como el mediador de la proliferación lactotropa mediada por estrógenos. Por otra parte, la expresión del receptor común para TGF- $\alpha$  y EGF, denominado EGFR, se correlaciona con una mayor agresividad biológica de adenomas hipofisarios, sobre todo de tipo somatotropo.<sup>76, 78</sup>

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) y sus receptores (FGFRs) regulan el desarrollo, crecimiento y angiogénesis. El FGBb (básico) fue descrito inicialmente en células hipofisarias de tipo folículoestrellado en bovinos e implicado en la regulación de la síntesis y secreción de hormonas hipofisarias. También se encuentra expresado en células de adenomas hipofisarios y se encuentra elevado a nivel sérico en pacientes afectados de este tipo de adenomas.<sup>76, 78</sup>

### 1.5.2.4. ACTIVACIÓN DE ONCOGENES

Son numerosos los oncogenes que han sido relacionados con el desarrollo en humanos de adenomas hipofisarios. Para algunos de ellos, importantes en la patogenia de otros tipos tumorales, como los oncogenes ras, c-myc o C-fos, solo parece existir un

papel esporádico en la patogenia de adenomas hipofisarios. Por otra parte, se ha detectado polimorfismo del gen de la ciclina D1 en series de tumores hipofisarios esporádicos.<sup>76, 77</sup>

Entre los oncogenes que juegan un papel importante en el desarrollo de tumores hipofisarios se ha señalado el oncogen *gsp*, a través de la expresión de proteínas G.<sup>77, 79</sup>

El oncogen denominado “pituitary tumor transforming gene” (PTTG) parece jugar un papel destacado y se encuentra sobreexpresado en la mayoría de los adenomas hipofisarios. Aunque el papel de PTTG en tumorigénesis de adenomas hipofisarios no está aclarado, se considera que puede tener un efecto estimulador sobre la proliferación celular, relacionarse con una mayor inestabilidad genética marcada por un aumento de aneuploidia y también incrementar la expresión de ciertos factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis y la neovascularización tumoral. A través de estos mecanismos se ha relacionado PTTG con el desarrollo de tumores hipofisarios, la existencia de índices de proliferación celular elevados frente a Ki67 y p 53, la tendencia a una mayor invasividad tumoral y un peor pronóstico.<sup>76, 77, 79</sup>

#### 1.5.2.5. GENES SUPRESORES DE TUMORES

Las mutaciones del gen de AIP (“aryl hydrocarbon receptor interacting protein”) se han correlacionado con la patogenia de adenomas hipofisarios familiares aislados (“familial isolated pituitary adenomas”: FIPA), con una prevalencia aproximada del 15%. Aunque puede detectarse en cualquier subtipo clínico de adenoma hipofisario, es más frecuente en casos de acromegalia, tumores en pacientes jóvenes y adenomas de gran tamaño e invasividad.<sup>76, 79, 80</sup>

La mutación del gen de la neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN-1) se detecta en un 70% de los pacientes afectados del síndrome MEN 1, enfermedad hereditaria con transmisión autosómica dominante caracterizada por la existencia de hiperparatiroidismo, adenoma hipofisario y tumores gastroenteropancreáticos. Esta mutación podría jugar un papel solo limitado en el caso de adenomas hipofisarios esporádicos, en los que se detecta aproximadamente en un 3,5% de los casos.<sup>79</sup>

La mutación GNAS (“guanine nucleotide-activating alpha subunit gene”) es la mutación somática relacionada con el síndrome de McCune-Albright. El síndrome se caracteriza por la existencia de una displasia fibrosa poliostótica, presencia de manchas cutáneas de color “café con leche” y anomalías endocrinológicas entre las que destaca la pubertad precoz, pudiendo encontrarse también adenomas hipofisarios. Esta mutación se encuentra también en hasta un 40% de casos de adenomas hipofisarios somatotropos esporádicos.<sup>79</sup>

Otros genes supresores posiblemente implicados en la tumorigénesis hipofisaria, son el gen del retinoblastoma (Rb) y las mutaciones CDK.<sup>76, 79</sup>

#### 1.5.2.6. ALTERACIONES EN LA SEÑAL MEDIADA POR PROTEINAS

La señalización alterada por las proteínas involucradas en la transducción de la señal de hormonas y factores de crecimiento, podría estar implicada en la oncogénesis de los tumores hipofisarios.<sup>76, 77</sup>

Se ha relacionado con este mecanismo a las proteínas G estimuladoras (Gs), por ejemplo para algún subtipo de adenoma somatotropo. Mutaciones de proteínas Ras son frecuentes en neoplasias no endocrinológicas y han sido descritas también en prolactinomas agresivos. La proteína-quinasa A es un holoenzima tetramérico implicado en la acción de cAMP. Mutaciones germinales de proteína-quinasa tipo 1 dependiente de cAMP (producto de PRKAR1A) se han asociado con el desarrollo del denominado complejo de Carney, caracterizado por el desarrollo de tumores hipofisarios y de otras glándulas endocrinas.<sup>76, 78</sup>

#### 1.5.2.7. ALTERACIONES EN LA INTERRELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS TUMORALES Y EL ESTROMA

El desarrollo de una neoplasia implica cambios y alteraciones en los mecanismos de adhesión intercelular y entre células tumorales y el estroma. De este modo, la pérdida de la trama de reticulina es un marcador morfológico que define la transición entre una hiperplasia y un adenoma y es utilizado de forma habitual en el diagnóstico histopatológico de los tumores hipofisarios.<sup>76,</sup>

Cambios en la adhesividad, con pérdida de afinidad por la matriz extracelular, implicados en la oncogénesis, se han correlacionado con la expresión de ptd-FGFR-4 en líneas celulares de tumores hipofisarios humanos. Esta pérdida de adhesividad sería debida a la disrupción de N-caderina, un complejo multiproteico relacionado con FGFR-4 y la molécula 1 de adhesión celular neural (NCAM-1). La expresión de ptd-FGFR-4 resulta en una expresión citoplásmica disminuida y ectópica de N-caderina y se asocia con tendencia a un crecimiento agresivo y a la invasividad de estas neoplasias. Del mismo modo la expresión de determinadas formas de NCAM-1, se correlaciona con crecimiento tumoral e invasividad.<sup>76</sup>

### 1.5.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

#### 1.5.3.1. PROLACTINOMAS

Con el desarrollo de un método analítico para la determinación de los niveles de PRL en 1970, se puso de manifiesto que los prolactinomas eran el tipo más frecuente de adenoma hipofisario funcionante. Su incidencia en la clínica se estima en unos 60 casos por millón de habitantes y año. La relación hombre mujer es aproximadamente 1/20 para microprolactinomas, pero es de 1/1 para macroadenomas. Los macroprolactinomas tienen además una mayor tendencia al crecimiento y suelen ser mayores en hombres que en mujeres, existiendo una correlación entre volumen tumoral y niveles de PRL.<sup>81-84</sup>

Los pacientes afectados de estas lesiones, presentan una clínica que es consecuencia de un estado de hiperprolactinemia. Los síntomas más comunes son la galactorrea, síntomas de disfunción sexual y osteopenia.<sup>82-84</sup>

El síntoma más característico es la galactorrea, presente en un 50% de las mujeres y un 35% de los hombres afectados de prolactinomas. Esta diferente incidencia en función de género, puede deberse a una menor susceptibilidad del tejido mamario masculino al estímulo de la PRL.<sup>82-84</sup>

Los síntomas de disfunción sexual se deben, tanto a la inhibición directa de la función ovárica o testicular por la PRL, como a un efecto inhibitorio de esta sobre la GnRH que interfiere con la pulsatilidad de la secreción de gonadotrofinas.

Las mujeres presentan amenorrea primaria o secundaria, oligomenorrea, menorragia, menarquia retrasada y/o infertilidad. Suelen asociar disminución de libido y sequedad vaginal.

Los hombres presentan alteraciones sexuales con disminución de libido e impotencia o eyaculación precoz. En situaciones de hiperprolactinemia prolongada, puede existir también oligospermia o azoospermia con infertilidad como consecuencia.

La pérdida de densidad ósea, aparece tanto en hombres como en mujeres y se considera relacionada con un déficit de esteroides sexuales, inducido por PRL.

Ante la existencia de síntomas que sugieran un estado de hiperprolactinemia, esta debe comprobarse mediante la determinación de niveles de PRL sérica. Su rango normal es de 5-20 ng/mL y la determinación puede realizarse en cualquier momento del día, dado que sus niveles son bastante constantes. No obstante, dado que situaciones como el sueño, ejercicio físico extenuante, comidas hiperproteicas o estimulación mamaria intensa, pueden producir ligeros aumentos de los niveles de PRL, cuando se detecta una hiperprolactinemia en el rango de 20-40 ng/mL, debe repetirse la analítica para confirmarlo.<sup>82-84</sup>

Cuando se ha demostrado analíticamente la existencia de niveles anormalmente elevados de PRL, el siguiente paso es la determinación de su origen, descartando en primera instancia las causas farmacológicas (utilización de medicamentos, entre los que destacan los estrógenos, neurolepticos, metoclopramida, antidepresivos, cimetidina, metil-dopa, reserpina, verapamil o risperidona) y las no hipofisarias.

Niveles séricos de PRL entre 20-200ng/mL, pueden ser debidos a cualquier causa de hiperprolactinemia. Cuando se detectan en presencia de un adenoma hipofisario, suele deberse a una pérdida de la inhibición hipotalámica sobre la síntesis adenohipofisaria de la hormona, secundaria a una compresión del tallo hipofisario. En

cualquier caso, se deben interpretar con precaución las concentraciones séricas de PRL en este rango, dado que en ocasiones puede tratarse de valores artefactualmente bajos, debido al denominado efecto “gancho” (ante niveles extremadamente elevados de PRL, sobre 5000 ng/mL, se puede producir un “bloqueo” de los anticuerpos utilizados en los tests diagnósticos, obteniéndose valores solo ligeramente altos que hagan pensar en el diagnóstico de un adenoma clínicamente no funcionante). Los prolactinomas o adenomas lactotropos suelen asociarse, por el contrario, a niveles de PRL superiores a 200 ng/mL (alcanzando incluso en ocasiones, cifras muy elevadas). No existen tests endocrinológicos de estimulación o supresión que permitan confirmar el diagnóstico.<sup>84</sup>

Tras haber confirmado la hiperprolactinemia, independientemente de sus niveles, y excluidas causas farmacológicas, se recomienda realizar una RMN hipofisaria para diagnosticar la posible existencia de una tumoración hipofisaria. En caso de ser positiva, se recomienda la determinación del resto de las hormonas hipofisarias.<sup>81-85</sup>

#### 1.5.3.2. ACROMEGALIA

En 1886, Pierre Marie publicó la primera descripción clínica de un caso de crecimiento somático desproporcionado al que denominó acromegalia e identificó en la literatura otros casos similares, descritos por otros autores. Fue más tarde cuando se relacionó este síndrome con los tumores hipofisarios. En 1900, Benda lo relacionó concretamente con adenomas hipofisarios con predominio de células eosinófilas a la tinción, a las que consideró hiperfuncionantes. Cushing, Davidoff y Bailey también publicaron casos en que se describían las características clínicas y patológicas de la acromegalia y describieron la remisión de los signos de afectación de tejidos blandos, tras la resección de adenomas hipofisarios. En 1921, Evans y Long publicaron los resultados de sus estudios experimentales, induciendo gigantismo en ratas, a las que se inyectaron extractos hipofisarios, confirmando la relación entre un factor hipofisario y el crecimiento somático.<sup>56, 58, 85</sup>

La incidencia estimada de acromegalia se estima entre 38 y 69 casos por millón de habitantes y la incidencia anual de casos nuevos en 3 a 4 casos por millón de habitantes.<sup>86-90</sup>

El efecto de los niveles elevados de GH sobre el organismo, lleva al crecimiento de tejidos blandos y partes acras, así como a una alteración de funciones metabólicas. El desarrollo de estos síntomas es habitualmente lento e insidioso, lo que hace el diagnóstico difícil y tardío.<sup>57, 86-90</sup>

El 98% de los pacientes afectados de acromegalia presentan crecimiento de partes acras, con afectación facial y de la zona distal de las extremidades. A nivel facial es característica la macroglosia, aumento de volumen de los labios y glándulas salivares e hipertrofia de mandíbula, pómulos y arcos ciliares. El crecimiento mandibular asociado al ensanchamiento maxilar, produce con frecuencia prognatismo, diastema dental y problemas de maloclusión. Suele aparecer también voz sonora y dificultad respiratoria con apneas del sueño e incluso narcolepsia, con relación a la hipertrofia de la laringe y de los senos paranasales. El incremento de tamaño de los huesos de manos y pies, asociado a la hipertrofia de los tejidos blandos es característico y progresivo y conduce a un aumento de la talla de anillos, brazaletes o el calzado.

Diferentes grados de artropatía ocurren en un 70% de los casos, con edema articular, hipermovilidad y engrosamiento cartilaginoso. Es frecuente la afectación de articulaciones de carga como rodillas y caderas, así como de hombros, codos, muñecas y articulaciones de la mano. A nivel raquídeo suele apreciarse un aumento de la longitud ántero-posterior de las vértebras con tendencia a la cifosis, fenómenos de discopatía degenerativa multinivel y proliferación de osteofitos. En algunos pacientes pueden darse fenómenos de calcificación de capsulas articulares y de osificación de ligamentos. El aumento de tamaño de los elementos articulares e incluso de los troncos nerviosos, conduce también con frecuencia a cuadros de neuropatía por compresión, entre los que destaca el síndrome del túnel del carpo. El fenómeno de Raynaud se describe en aproximadamente un tercio de los casos. En casos de larga evolución, se trata de alteraciones articulares severas, que conducen a una progresiva limitación de la capacidad funcional para al menos un 50% de los enfermos, a lo largo de su vida.

La hiperhidrosis es también un fenómeno común y afecta a aproximadamente un 70% de los pacientes. La piel y el vello suelen estar engrosados, lo que se atribuye a deposición de glicosaminglicanos y aumento de producción de tejido conectivo.

Existe una cardiopatía sintomática en al menos un 20% de los pacientes. La hipertensión arterial existe en un 50% de los casos, de los cuales la mitad sufren una disfunción ventricular izquierda, que es debida a hipertrofia miocárdica, fibrosis intersticial e infiltrados linfocitarios miocárdicos. Diferentes alteraciones electrocardiográficas en reposo, se detectan en un 50% de casos. La afectación cardiaca es causa importante de morbilidad, y es la causa de muerte en aproximadamente un 60% de los casos, condicionando una reducción de la esperanza de vida de los enfermos.

Desde el punto de vista endocrinológico, son frecuentes las complicaciones. Aproximadamente un 30% de los pacientes presentan hiperprolactinemia, con o sin clínica de galactorrea. Esta elevación de los niveles de PRL en acromegálicos, puede ser debida a hiperproducción hipofisaria causada por una pérdida de la inhibición hipotalámica por fenómenos de compresión de tallo hipofisario o bien a la secreción concomitante de GH y PRL por determinados subtipos tumorales. Por otra parte, el efecto anti-insulínico directo de la GH, produce intolerancia a los hidratos de carbono y, con frecuencia, diabetes mellitus insulino-dependiente. Pueden también aparecer otras alteraciones endocrinológicas como hipertrigliceridemia, hipercalcemia e hipercalcemia.

La asociación de acromegalia con la presencia de pólipos benignos de colon es frecuente y se ha descrito hasta en un 45% de los casos de algunas series. La relación entre acromegalia y una mayor incidencia o mortalidad por cáncer, no se ha demostrado hasta el momento.

El conjunto de alteraciones cardiacas, respiratorias y metabólicas asociadas a la acromegalia, condicionan una reducción de la esperanza de vida para estos pacientes. Los factores fundamentales asociados a la mortalidad son los niveles elevados de GH y la existencia de una cardiopatía previa al diagnóstico. Por otra parte, la normalización de los niveles de GH tras tratamiento, reducen de forma significativa este riesgo de morbi-mortalidad.<sup>86-90</sup>

### 1.5.3.3. ENFERMEDAD DE CUSHING

En 1912, Harvey Cushing describió el caso de una paciente de 23 años de edad, con obesidad, hirsutismo y amenorrea. Veinte años más tarde, apuntó que la causa de

este síndrome al que denominó poliglandular, era un trastorno hipofisario primario que producía secundariamente una hiperplasia adrenal. El conjunto de síntomas y signos de esta enfermedad es debido a la exposición prolongada a un exceso de glucocorticoides libres en plasma. Las causas del síndrome de Cushing son variadas e incluyen patología hipofisaria, tumores de la glándula suprarrenal, secreción ectópica de ACTH o el efecto de la excesiva administración exógena de glucocorticoides (yatrogénico). El término enfermedad de Cushing queda reservado a los casos de síndrome de Cushing de origen central, debido a una lesión hipofisaria que causa una secreción excesiva de ACTH y su incidencia se estima entre 5 y 10 casos por millón de habitantes y año.<sup>58, 91-93</sup>

La obesidad es el síntoma más frecuente de la enfermedad y, al menos en adultos, suele ser de distribución centrípeta. En niños sin embargo puede manifestarse como una obesidad generalizada. Es característico también el que se produzcan depósitos localizados de grasa en el área de tránsito cérico-torácico de la columna vertebral (“giba de búfalo”), en el hueco supraclavicular, a nivel de las mejillas (cara de “luna llena”) y en la región temporal del pericráneo. Puede producirse también este acúmulo en el espacio epidural del canal raquídeo, lo que en algunos casos, aunque de forma infrecuente, puede dar lugar a una mielopatía compresiva.<sup>91-93</sup>

La disfunción gonadal es también frecuente y se manifiesta como una pérdida de la libido en varones e irregularidades menstruales en mujeres. Suele asociarse a hirsutismo con hipertrichosis facial. Suele existir un hipogonadismo, relacionado con un efecto inhibitorio directo del cortisol sobre la pulsatilidad de la secreción de la GRH.

Los trastornos psiquiátricos aparecen aproximadamente en un 50% de los pacientes afectados de un síndrome de Cushing. La depresión, la letargia, las alteraciones de la memoria y las funciones cognitivas o la irritabilidad son frecuentes, pero también se manifiestan como diferentes tipos de psicosis.

La afectación ósea más común en adultos es la osteoporosis, con un aumento de la incidencia de fracturas patológicas, sobre todo vertebrales. Es característica desde el punto de vista radiológico, la aparición de callos de fractura exuberantes. Como en el caso del síndrome de Cushing yatrogénico, también en la enfermedad de Cushing puede ocurrir una necrosis aséptica de las cabezas femorales o humerales. No es frecuente la

hipercalcemia, pero sí la hipercalciuria que, secundariamente, puede producir nefrolitiasis. En niños, la forma de presentación más común es un escaso crecimiento, asociado a ganancia ponderal.

En la piel es característico que se manifieste como un engrosamiento cutáneo, asociado a separación y exposición de la vascularización del tejido celular subcutáneo. La característica cutánea más frecuente, casi patognomónica y más frecuente en pacientes jóvenes (menores de 50 años), es la aparición de estrías “rojo vinosas”, mayores de 1 centímetro de anchura, en el abdomen, muslos, pechos o brazos. A la exploración también suelen evidenciarse arrugas en el dorso de la mano (signo de Liddle), aparición de lesiones papulares en la cara y el torso o el acné. Con frecuencia existe una fragilidad capilar que favorece la aparición de hematomas ante mínimos traumatismos (como ocurre en la púrpura senil).

La miopatía corticoidea y la facilidad de aparición de hematomas musculares es la forma típica de afectación muscular por la enfermedad. La miopatía se manifiesta como debilidad y atrofia muscular que afecta predominantemente a la musculatura proximal de los miembros inferiores y a la de la cintura escapular en miembros superiores.

La incidencia de infecciones de cualquier tipo, es superior en pacientes afectados de un síndrome de Cushing, en comparación con la población normal. No es inhabitual que sean asintomáticas o paucisintomáticas, como consecuencia de la supresión de la normal respuesta inflamatoria que es causada por el hipercortisolismo. Pueden aparecer infecciones fúngicas oportunistas, así como afectación de piel (tiña versicolor) y uñas. Las infecciones de heridas y la dificultad de cicatrización de las mismas es frecuente. Se ha descrito también por ejemplo la reactivación de una tuberculosis, incluso como forma de debut de la enfermedad.

A nivel ocular es frecuente el glaucoma. En aproximadamente un tercio de los casos descritos inicialmente por Cushing se describió un exoftalmos, atribuible a depósito de grasa en la parte posterior de la órbita. Las cataratas, que son una complicación yatrogénica común de la terapia corticoidea, son sin embargo infrecuentes, excepto como complicación de diabetes intercurrente.

Son muy habituales las alteraciones metabólicas y endocrinológicas. La diabetes mellitus se da en aproximadamente un tercio de los casos y, en los restantes es común la intolerancia a los hidratos de carbono. La activación de la síntesis hepática de lipoproteínas suele manifestarse como hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Pueden aparecer manifestaciones de exceso de mineralcorticoides circulantes, con manifestaciones de alcalosis hipokaliémica, que es más frecuente en los casos de síndrome de secreción ectópica de ACTH (hasta un 90% de los casos). También son característicos los síntomas de hipofunción secundaria de los ejes tiroideo y gonadal y el déficit de secreción de GH.

La afectación cardiovascular es común. La hipertensión arterial es su manifestación más habitual y aparece en hasta un 75% de los casos, siendo más frecuente la asociación desde un punto de vista epidemiológico entre esta y la enfermedad de Cushing, comparada con la de los pacientes que asocian únicamente obesidad. También es mayor la asociación de problemas tromboembólicos. La mayor incidencia de hipertensión arterial, sumada a los efectos metabólicos de la enfermedad, condiciona un aumento de la mortalidad cardiovascular de los pacientes afectados de un síndrome de Cushing no tratado.

Está indicada la realización de estudios diagnósticos para descartar una enfermedad de Cushing en pacientes con hipertensión arterial (HTA) y/o diabetes mellitus (DM) de difícil control, en pacientes con obesidad de rápida progresión y difícil control, en pacientes menores de 65 años con osteoporosis severa y al menos otro dato clínico que sugiera hipercortisolismo y en pacientes con síndrome de ovario poliquístico y al menos otro dato clínico que sugiera hipercortisolismo.

En la fase de screening se requiere la utilización de pruebas de elevada sensibilidad. Como estudios de inicio se recomienda la determinación de cortisol libre en orina de 24 horas y el test de supresión con dosis baja de dexametasona. También puede utilizarse como test de screening la determinación del cortisol salivar nocturno. Los niveles normales de cortisol libre urinario son diferentes para distintos laboratorios y en función de la técnica de medida empleada (habitualmente radioinmunoensayo). En casos de sospecha de Cushing leve, se recomienda repetir la determinación en 2-3

ocasiones, debido a las fluctuaciones en su producción diaria. El test de supresión con dosis baja de dexametasona se realiza determinando los niveles de cortisol sérico a las 08:00 horas de la mañana, previa administración de 1 mg de dexametasona a las 23:00 horas de la noche anterior. Se considera normal una supresión de la secreción de cortisol con niveles inferiores a 1,8  $\mu\text{g/dL}$ . Como alternativa, el test puede realizarse administrando 0,5 mg de dexametasona cada 6 horas durante dos días consecutivos, midiendo el nivel de cortisol sérico de las 08:00 horas de la mañana o el cortisol libre urinario (CLU) al día siguiente. Con estas pruebas, un nivel normal de CLU en orina de 24 horas y una supresión con cortisol sérico a las 08:00 horas inferior a 1,8  $\mu\text{g/dL}$  excluyen un hipercortisolismo, mientras que los valores contrarios lo confirman.<sup>91</sup>

En caso de discordancia entre ambos valores o ante sospecha fundada de diagnóstico de pseudo-Cushing, se recomienda realizar la medición de los niveles de cortisol nocturno. El estudio consiste en la toma de una sola muestra de sangre o saliva a las 23:00 horas. Para el cortisol sérico (que debe medirse con el sujeto libre de condiciones de stress y, por tanto, a través de una vía venosa previamente canalizada), se consideran normales valores inferiores a 1,8  $\mu\text{g/dL}$  si el paciente está dormido o de 7,5  $\mu\text{g/dL}$  si está despierto. También pueden utilizarse el test de CRH tras frenación débil con dexametasona, el test de desmopresina o el de hipoglucemia insulínica, en el diagnóstico diferencial entre Cushing y pseudo-Cushing<sup>91</sup>

Una vez confirmada la existencia de un hipercortisolismo, se realizan una serie de pruebas de localización, con el objetivo de establecer su causa. Se recomienda como prueba inicial la determinación de niveles de ACTH mediante ensayos ultrasensibles que permitan detectar valores bajos de la hormona. Valores de ACTH inferiores a 5  $\text{pg/mL}$  orientan hacia el diagnóstico de un hipercortisolismo de origen suprarrenal y hacen necesaria la realización de una TAC de suprarrenales. Valores superiores a 15  $\text{pg/mL}$ , orientan por el contrario al diagnóstico de un Cushing ACTH-dependiente de origen hipofisario (enfermedad de Cushing) o de origen ectópico (por ejemplo tumores carcinoides, tumores de células de islotes pancreáticos, carcinoma medular de tiroides o feocromocitoma). Para pacientes con niveles de ACTH entre 5 y 15  $\text{pg/mL}$ , lo más probable es que se trate de un hipercortisolismo ACTH-dependiente, habiéndose

recomendado la realización de un test de estímulo con CRH para su confirmación (la ausencia de estimulación sugeriría un origen suprarrenal del cuadro).

Ante la sospecha diagnóstica de una enfermedad de Cushing (hipercortisolismo ACTH-dependiente de origen hipofisario), debe realizarse una RMN hipofisaria. La presencia de un tumor hipofisario en este estudio de imagen, confirmará el diagnóstico. No obstante, hasta un 30% de los pacientes pueden tener una RMN hipofisaria normal (por ejemplo en casos de adenomas de muy pequeño tamaño o en otros causados por una hiperplasia glandular sin la existencia de una masa tumoral). En estos casos debe realizarse un cateterismo de senos petrosos. También puede utilizarse un test de estimulación con CRH o desmopresina. Los tests de estimulación con CRH pueden no ser posibles en algunos medios por la imposibilidad de contar con la misma y los resultados al estímulo con desmopresina tienen baja especificidad. El test de supresión con dosis altas de dexametasona se realiza administrando dosis de 2 mg cada 6 horas durante dos días consecutivos o bien con la administración de una dosis única de 8 mg a las 23:00 horas y determinación de niveles de cortisol a las 08:00 de la mañana del día siguiente. Una supresión mayor o igual al 50% sugiere un diagnóstico de enfermedad de Cushing. El muestreo de senos petrosos inferiores es la prueba más específica para establecer el diagnóstico diferencia entre una enfermedad de Cushing y un hipercortisolismo ACTH-dependiente de origen ectópico. Requiere la cateterización selectiva de ambos senos, para medir los niveles de ACTH en sangre venosa obtenida en cada uno de ellos y, además, en una vena periférica. La toma de muestras se realiza un 1 y 0 minutos antes y 3, 5, 10 y 15 minutos tras la administración de 100 µg de CRH por vía intravenosa. La existencia de un gradiente central/periférico mayor de 3 tras estímulo con CRH, es diagnóstico de enfermedad de Cushing. La determinación simultánea de PRL, puede garantizar que la cateterización ha sido correcta y ser útil en la interpretación de los gradientes. La existencia además de un gradiente lateral en la cateterización de ambos senos petrosos inferiores, puede determinar la existencia de una lateralización en la secreción que permite guiar un eventual tratamiento quirúrgico. En los casos en que estos resultados sugieren el diagnóstico de un hipercortisolismo ACTH-dependiente de origen ectópico, está indicada la realización de una TAC con contraste tóraco-abdomino-pélvica como estudio de imagen.<sup>91-93</sup>

#### 1.5.3.4. GONADOTROPINOMAS

Los gonadotropinomas son infrecuentes desde un punto de vista clínico. Dado que no suelen producir niveles elevados de gonadotropinas, suelen clasificarse dentro del grupo de los adenomas hipofisarios no funcionantes. Por otra parte, el pequeño grupo de tumores que producen niveles séricos elevados de FSH, LH o subunidad  $\alpha$ , que serían considerados adenomas funcionantes, no suelen asociarse con manifestaciones endocrinológicas específicas.<sup>58, 94</sup>

El único signo de secreción de FSH por un adenoma hipofisario es la detección de niveles séricos elevados de FSH con niveles bajos de LH. Aunque parece paradójico, sus manifestaciones cuando están presentes suelen ser de hipogonadismo. Algunas mujeres pueden aquejar dolor pélvico causado por hiperestimulación ovárica.<sup>94</sup>

Los tumores que secretan LH son extremadamente raros y pueden manifestarse en varones por elevación de los niveles séricos de testosterona y piel grasa.<sup>94</sup>

#### 1.5.3.5. TIROTROPINOMAS

Los tirotropinomas son raros, representan aproximadamente el 1% del total de los adenomas hipofisarios y se ha descrito para ellos una mayor tendencia al crecimiento y la invasión de estructuras vecinas.<sup>95, 96</sup>

Desde el punto de vista clínico, sus manifestaciones son las de un hipertiroidismo. Entre los síntomas y signos más frecuentes están las palpitaciones, las arritmias, pérdida de peso, temblor, nerviosismo e irritabilidad o el bocio.<sup>95</sup>

Los hallazgos bioquímicos característicos en pacientes afectados de un hipertiroidismo secundario causado por un adenoma secretor de TSH, son los niveles normales o elevados de TSH sérica y niveles también elevados de tiroxina total y libre ( $T_4$ ) y de triyodotironina ( $T_3$ ). En aquellos casos en que los niveles de TSH se encuentran dentro del rango de la normalidad (aproximadamente un 30% de los pacientes), se trata de valores “normales” inapropiados con relación a los niveles elevados de  $T_4$  y  $T_3$ . Además, como dato sugestivo de una secreción autónoma de TSH por el tejido tumoral, puede detectarse una pérdida del pico nocturno de TSH y una

ausencia de respuesta a test de estímulo con TRH, en la mayor parte de los pacientes.<sup>95,96</sup>

Aproximadamente un 85% de los pacientes afectados de un tirotropinoma, tienen una alta concentración sérica de la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glicoproteicas, siendo este incremento relativo superior al de la TSH sérica y resultando en una relación molar elevada para el cociente subunidad  $\alpha$  / TSH. Por este motivo, se recomienda determinar esta subunidad  $\alpha$  en pacientes con niveles elevados de T4 y T3 y con TSH no suprimida.<sup>95, 96</sup>

Ante estos hallazgos bioquímicos, se recomienda la realización de una RMN hipofisaria. Si en ella se detecta un tumor hipofisario, el diagnóstico probable es de tirotropinoma. No obstante, hay que considerar la posibilidad de que pueda tratarse de un incidentaloma. En consecuencia, y debido por otra parte a la dificultad para establecer el diagnóstico diferencial entre estos pacientes y los casos de resistencia a la hormona tiroidea, se considera indicado el análisis de mutaciones de gen del receptor  $\beta$  de la hormona tiroidea. Aunque un 15% de los enfermos con resistencia a hormonas tiroideas (RHT) no tienen mutaciones del gen TR $\beta$ , su presencia descarta el diagnóstico de un adenoma hipofisario secretor de TSH.<sup>95</sup>

#### 1.5.3.6. ADENOMAS NO FUNCIONANTES

Los verdaderos adenomas hipofisarios no funcionantes son los de tipo null cell (no expresan producción de hormonas hipofisarias en los estudios inmunohistoquímicos), pero en las series clínicas se incluyen en este grupo un número significativo de gonadotropinomas asintomáticos. La incidencia anual de los adenomas hipofisarios no funcionantes, es de 3-5 casos por millón de habitantes y año. La distribución por géneros es similar o ligeramente superior en varones y, en la mayor parte de los casos, se presenta en personas mayores de 50 años.<sup>97</sup>

Dado que se caracterizan por no secretar ninguna hormona en exceso, no producen ningún síndrome endocrinológico. Sus manifestaciones son por lo tanto indirectas y dependientes de su efecto de masa, que es debido a la compresión que el

tumor, cuando alcanza un tamaño suficiente, produce sobre las estructuras vecinas. Al tratarse de tumores benignos de lento crecimiento, los síntomas suelen presentarse de forma lentamente progresiva a lo largo de años.<sup>58, 97</sup>

La cefalea, aunque inespecífica, es el síntoma ocasionado con mayor frecuencia por los adenomas hipofisarios, independientemente de su tamaño. Los cambios de presión, incluso de pequeña entidad y confinados al espacio intraselar en el caso de pequeños adenomas, pueden producir una tensión aumentada sobre las meninges de la base craneal o el diafragma selar y ser causa de dolor de cabeza persistente. La severidad de la cefalea no se asocia con el tamaño tumoral.<sup>97</sup>

El crecimiento supraselar de los adenomas hipofisarios tiene como consecuencia la compresión del quiasma óptico. Anatómicamente, esta compresión inferior del quiasma afecta predominantemente al cruce de las fibras nasales de los nervios ópticos, produciendo un trastorno de campo visual que se caracteriza por el desarrollo progresivo de una hemianopsia bitemporal. Inicialmente la pérdida afecta a los campos temporales superiores, se extiende posteriormente a la totalidad de los mismos y en última instancia puede afectar a los campos nasales, produciendo en último caso una ceguera.<sup>97</sup>

La extensión lateral de los adenomas de la hipófisis puede producir una invasión de los senos cavernosos. Esta invasión puede afectar a los nervios óculo-motores (III, IV y VI) y, como consecuencia de la misma, pueden aparecer diferentes grados de alteración de la movilidad del globo ocular, causando diplopía, oftalmoparesia evidente y/o ptosis palpebral. También puede afectar a la primera y segunda ramas del trigémino ( $V_1$  y  $V_2$ ), cuya disfunción puede ocasionar diferentes grados de alteración en la sensibilidad de las regiones maxilar y mandibular de la cara (produciendo en algunos casos hipoestesia y en otros hiperestesia o incluso dolor irritativo con neuralgia trigeminal). La invasión del seno cavernoso hace que con frecuencia el tumor englobe a la arteria carótida interna en esta región y, aunque es infrecuente, puede provocar su estenosis que puede manifestarse como síntomas de isquemia del territorio cerebral correspondiente.<sup>97</sup>

El crecimiento inferior de los adenomas hipofisarios produce una invasión del seno esfenoidal. En la mayoría de ocasiones, esta invasión es asintomática. Algunos tumores agresivos pueden invadir las estructuras óseas y mucosas de la zona y producir obstrucción nasofaríngea y una mayor incidencia de infecciones locales. En algunos casos pueden dar lugar también a fistulas de líquido céfalo-raquídeo (LCR) que se manifiestan por una rinolicuorrea.

De forma excepcional aparecen tumores invasivos gigantes de una gran agresividad. En estos casos pueden invadir las estructuras de la base craneal en las fosas anterior y media, los nervios olfatorios (causando anosmia), los lóbulos frontal y/o temporal del cerebro (causando alteraciones conductuales y/o crisis comiciales) o el hipotálamo (causando importantes alteraciones endocrino-metabólicas).<sup>97</sup>

El diagnóstico de los adenomas hipofisarios no funcionantes implica la realización de un estudio completo de la función hormonal hipofisaria. En ellos no existen datos de hipersecreción hormonal. La compresión de la glándula hipofisaria normal por un adenoma en crecimiento, puede causar un hipopituitarismo secundario y la pérdida del estímulo inhibitorio hipotalámico sobre la adenohipófisis, debida a una compresión del tallo hipofisario, se manifiesta por la aparición de una hiperprolactinemia moderada (por lo general inferior a 100 ng/ml). La detección de un adenoma hipofisario en un estudio de RMN hipofisaria, es la prueba diagnóstica de confirmación. En macroadenomas con extensión supraselar que contacten con la vía óptica o ante síntomas subjetivos de alteración de la función visual, debe realizarse un estudio neuro-oftalmológico (determinación de agudeza visual, campimetría, valoración de la función de óculo-motores y valoración del fondo de ojo).<sup>94, 97-99</sup>

#### 1.5.4. DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

##### 1.5.4.1. RMN HIPOFISARIA

La RMN es actualmente es el método diagnóstico de elección, entre las técnicas de diagnóstico por la imagen.<sup>100, 101</sup> Permite establecer el diagnóstico de lesión selar y su tipo, un diagnóstico diferencial entre los diferentes tipos de lesiones selares (adenomas hipofisarios, meningiomas, craneofaringiomas, quistes de la bolsa de

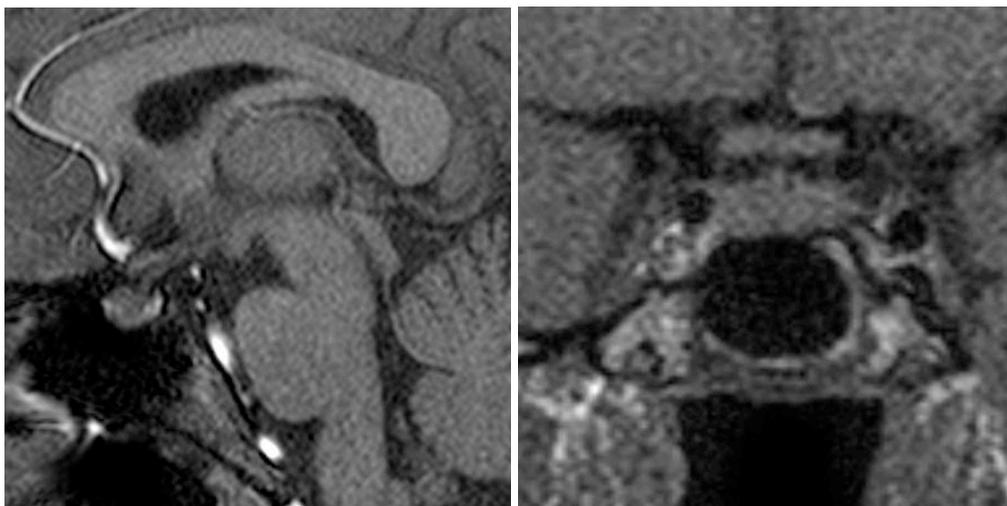
Rathke, etc.), clasificar a los adenomas hipofisarios en función de su tamaño (microadenomas y macroadenomas) y establecer el patrón de invasividad de estas lesiones.

El protocolo de diagnóstico de imagen por RMN de las lesiones selares y paraselares incluye la realización de secuencias sagitales y coronales, potenciadas en T1 y T2, antes y después de la administración de contraste paramagnético por vía intravenosa (Gd-DTPA, a una dosis de 0'1 ml/kg de peso).<sup>101</sup>

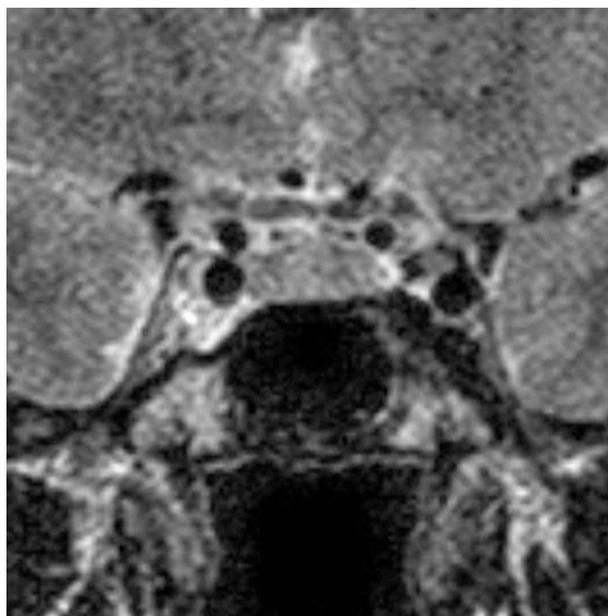
La valoración de la imagen por RMN de la glándula hipófisis permite la identificación de numerosos detalles de su anatomía como la diferenciación de la adenohipófisis, la neurohipófisis y el tallo hipofisario, así como las variaciones en sus características morfológicas (tamaño y forma) que, en condiciones fisiológicas, tienen lugar en diferentes momentos de la vida. También permite la caracterización de las principales estructuras adyacentes a la silla turca como los senos cavernosos, las arterias carótidas, la cisterna supraselar, el quiasma óptico y el seno esfenoidal.<sup>102</sup>

La adenohipófisis normal muestra una señal homogénea e isointensa, tanto en secuencias T<sub>1</sub> como T<sub>2</sub>, con la de la sustancia blanca del cerebro. Tras la administración de contraste paramagnético, presenta una intensa captación homogénea.<sup>102</sup>

El lóbulo posterior hipofisario muestra característicamente una señal hiperintensa en T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>, que la diferencia claramente de la adenohipófisis y que se relaciona con la presencia de desmopresina.<sup>103, 104</sup> Aunque la ausencia de esta hiperintensidad puede verse en individuos normales, también se ha relacionado con la existencia de una diabetes insípida central.<sup>104</sup>



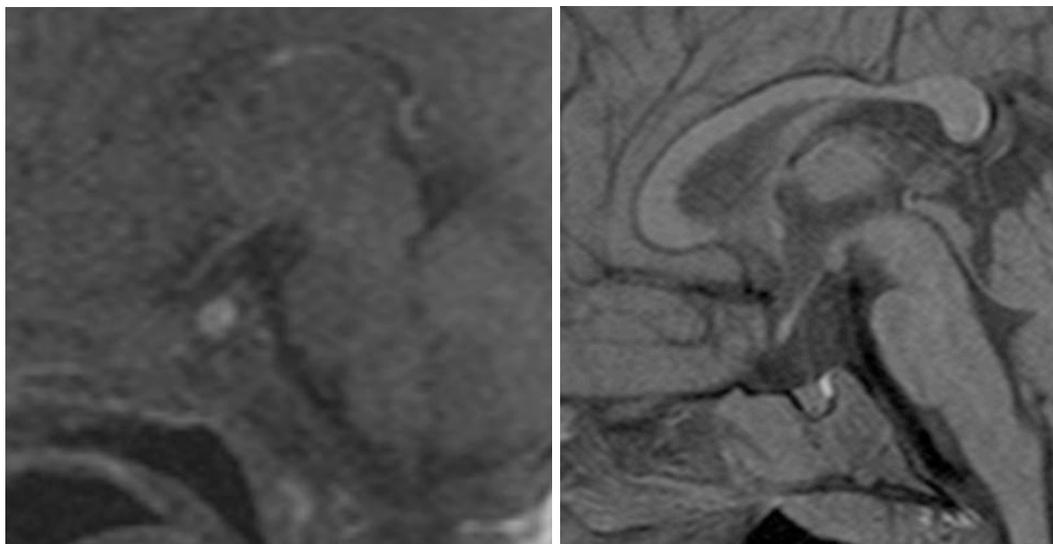
**Figura 3.-** RMN hipofisaria. Secuencias sagital (izquierda) y coronal (derecha) T<sub>1</sub> sin contraste



**Figura 4.-** RMN hipofisaria. Secuencia coronal T<sub>2</sub> sin contraste

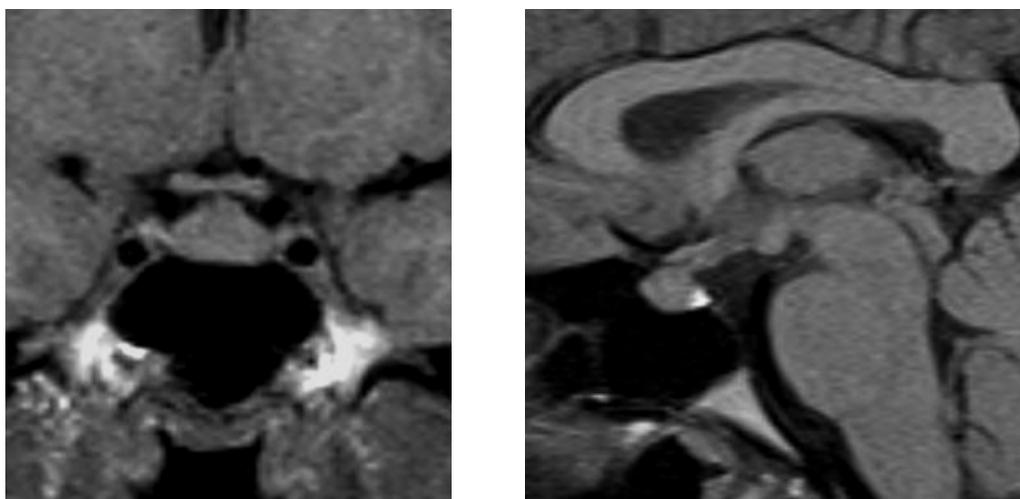
La glándula hipófisis experimenta unos cambios característicos en su forma y tamaño en diferentes etapas de la vida del individuo, relacionados con cambios en su fisiología bajo determinadas circunstancias. En neonatos, la glándula es típicamente convexa en su contorno superior e hiperintensa con relación a la señal de la protuberancia del tronco de encéfalo en las secuencias T<sub>1</sub>. Estas características suelen observarse durante los dos primeros meses de vida y, a partir de ese momento cambian, adoptando una morfología plana y una señal isointensa con la del puente. Durante la infancia se produce un incremento de tamaño global de la glándula, sin presentar

diferencias de género significativas, siendo su contorno superior plano o ligeramente cóncavo y su altura media en el plano sagital de entre 2 y 6 mm.<sup>101</sup>



**Figura 5.-** RMN hipofisaria. Imagen sagital T<sub>1</sub> sin contraste a los 21 días (izquierda) y 21 meses (derecha) de edad respectivamente.

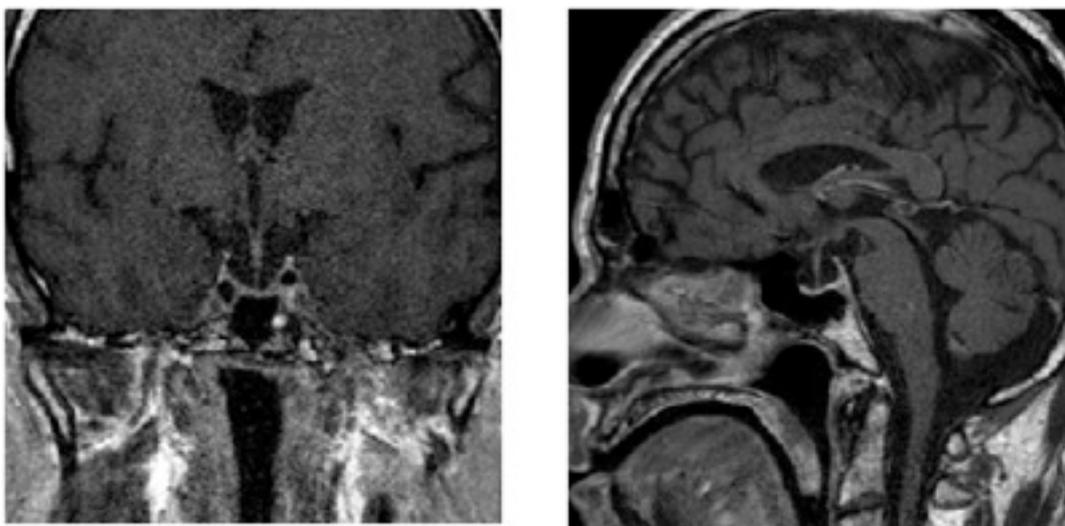
En la pubertad se producen los mayores cambios morfológicos, alcanzando su mayor tamaño. En mujeres puede alcanzar una altura de hasta 10 mm, mientras que en varones mide en torno a 7-8 mm. En niñas púberes puede mostrar una marcada convexidad de su contorno superior e incluso proyectarse por encima del límite superior de la silla turca.



**Figura 6.-** RMN hipofisaria. Paciente mujer de 14 años de edad. Imagen coronal (izquierda) y sagital (derecha) T<sub>1</sub> sin contraste. Contorno superior convexo de la glándula.

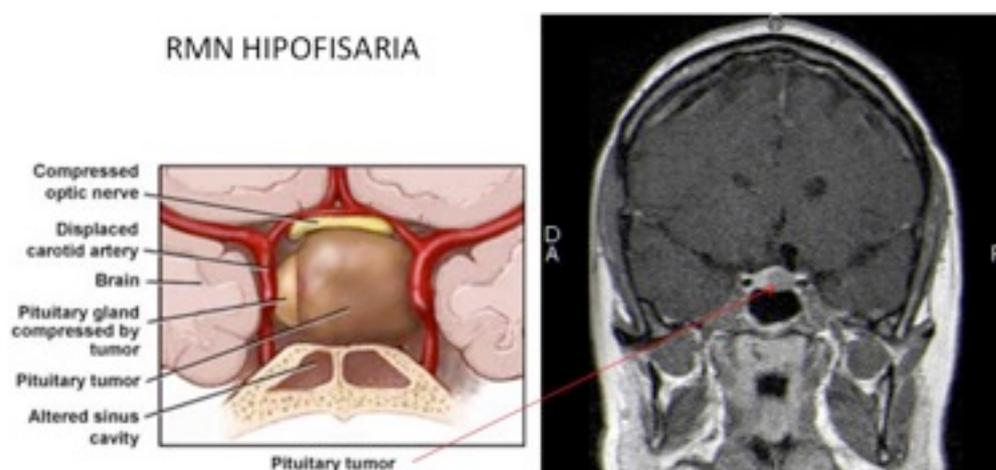
Otra circunstancia en la que puede producirse una importante hipertrofia fisiológica de la glándula es el embarazo, Durante este, puede producirse un incremento de su peso y tamaño de entre un 30 y un 100%, con relación a la situación basal. Hacia el tercer trimestre de gestación suele medir hasta 10 mm de altura y de nuevo presenta, como durante la pubertad, un contorno superior convexo. Tanto durante la gestación como a lo largo de la primera semana tras el parto, su imagen es hiperintensa en las secuencias T<sub>1</sub>.

Durante la juventud y madurez, la imagen de la glándula se estabiliza y adopta una morfología cóncava en su contorno superior. A partir de los 6<sup>a</sup> década de la vida se produce una involución fisiológica, probablemente relacionada con la disminución de su actividad tras la menopausia o la andropausia. Estos signos de envejecimiento consisten en una disminución global de su tamaño, manteniendo su intensidad y una morfología cóncava de su contorno superior, También en este periodo es más frecuente la ausencia del brillo normal de la neurohipófisis o la existencia del denominado síndrome de la silla turca vacía.<sup>101</sup>

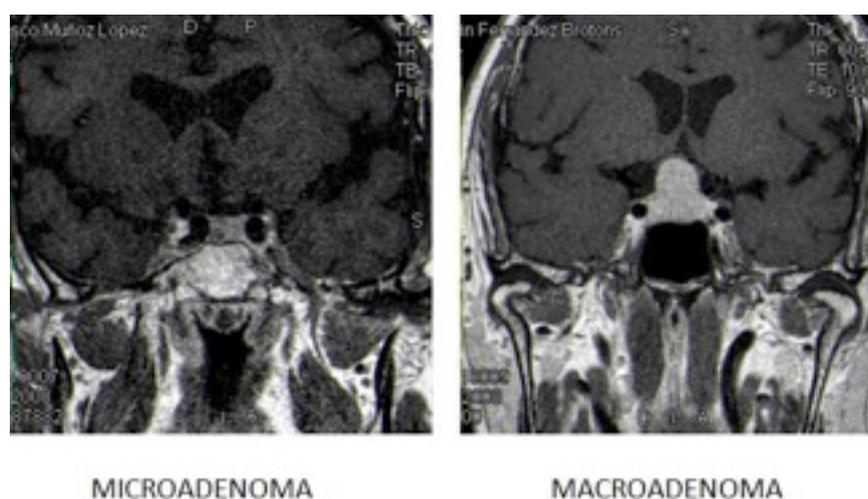


**Figura 7.-** RMN hipofisaria. Paciente varón de 76 años de edad. Imagen coronal y sagital T<sub>1</sub> con contraste. Involución glandular. Disminución de tamaño y contorno superior bicóncavo de la glándula.

Los adenomas hipofisarios son el tipo de patología que con mayor frecuencia se diagnostica en la silla turca. En función de su tamaño pueden clasificarse en dos grupos: microadenomas (tumores menores de 10 mm de diámetro mayor) y macroadenomas (tumores iguales o mayores de 10 mm de diámetro mayor). Se ha propuesto la existencia de un tercer grupo de adenomas en función de su tamaño, que recibirían el nombre de picoadenomas y se definirían por un diámetro mayor inferior a 3 mm, por lo que característicamente no serían visibles en los estudios de imagen por RMN.<sup>100, 105</sup>



**Figura 8.-** Esquema (izquierda) e imagen de adenoma hipofisario en corte coronal (derecha), correspondiente a secuencia T1 con contraste de RMN hipofisaria.

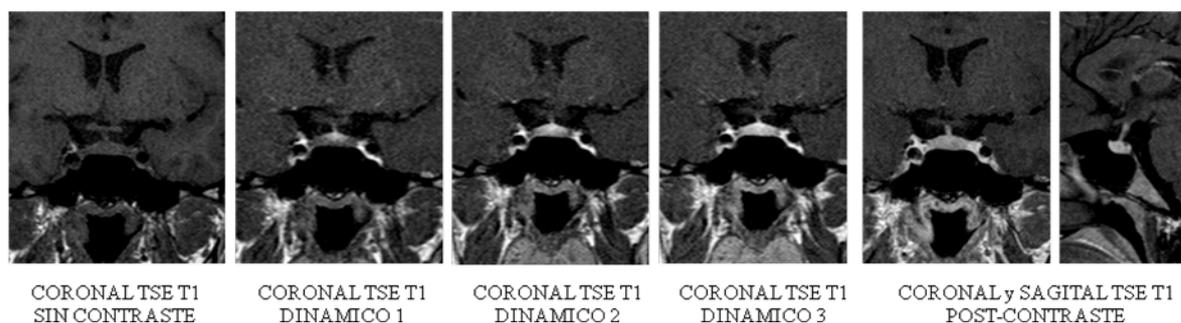


**Figura 9.-** RMN hipofisaria. Imagen coronal T<sub>1</sub> con contraste. Microadenoma hipofisario (izquierda). Macroadenoma hipofisario (derecha).

Alrededor de un 80-90% de los microadenomas son hipointensos en T<sub>1</sub>, con relación a la imagen del resto de la glándula. Los restantes suelen ser isointensos y, por

ese motivo, no son identificables antes de la administración de contraste paramagnético. Ocasionalmente pueden presentar una señal hiperintensa en T<sub>1</sub> que por lo general se relaciona con la presencia de hemorragias intratumorales. En las secuencias T<sub>2</sub>, entre un 30 y un 50% de los microadenomas son hiperintensos (sobre todo los prolactinomas), lo que puede ayudar a su diagnóstico.<sup>100, 101, 105, 106</sup>

Tras la administración de gadolinio, los microadenomas suelen mostrar una imagen hipointensa con respecto a la de glándula normal, dado que los tumores presentan un patrón retardado de captación de contraste con respecto a la hipófisis. No obstante no es infrecuente, en particular en el caso de pequeños microadenomas, que su señal sea hipointensa dificultando su diagnóstico. En estos casos se utilizan los denominados estudios dinámicos, en los que tras la administración de un bolo de contraste paramagnético se obtienen secuencialmente imágenes consecutivas en el tiempo, separadas por intervalos de 5 a 10 minutos, en los que puede identificarse la imagen típicamente hipointensa del adenoma.<sup>107</sup>



**Figura 10.-** RMN hipofisaria. Imagen coronal T<sub>1</sub> con contraste. Estudio dinámico de un microadenoma hipofisario.

El diagnóstico mediante RMN de los macroadenomas hipofisarios suele ser sencillo debido a su mayor tamaño. Por lo general suelen ser isointensos en las secuencias T<sub>1</sub>. En las secuencias T<sub>2</sub> pueden ser heterogéneos, con algunas áreas de hiperintensidad y otras de necrosis o de degeneración quística. Tras la administración de contraste pueden presentar diferentes patrones de captación de contraste, pudiendo presentar imágenes hipointensas, isointensas o hiperintensos con relación a las imágenes T<sub>1</sub> en vacío.<sup>100, 101, 105, 106</sup>

Algunos macroadenomas pueden tener un comportamiento agresivo y mostrar invasión de las estructuras vecinas a la silla turca.



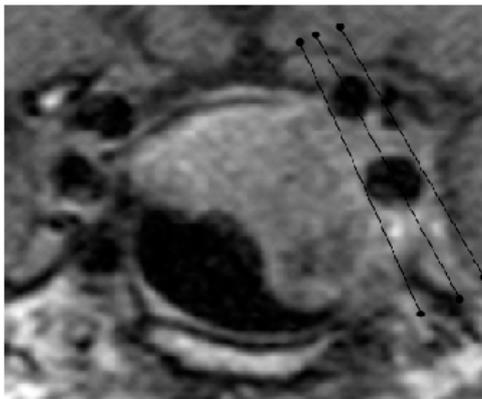
MACROADENOMA  
INVASIVO

**Figura 11.-** RMN hipofisaria. Imagen coronal T<sub>1</sub> con contraste. Macroadenoma hipofisario invasivo con áreas de hemorragia intratumoral.

El crecimiento supraselar de los adenomas puede hacer que contacten o que desplacen y compriman al quiasma óptico. Incluso en algunas ocasiones pueden desplazar el suelo o incluso crecer en el interior del III ventrículo.<sup>108</sup>

También en algunos casos pueden invadir lateralmente los senos cavernosos, posteriormente el clivus o inferiormente el suelo de la silla, ocupando el seno esfenoidal.<sup>109</sup>

Para macroadenomas invasivos, el grado de invasión lateral de los senos cavernosos se considera un factor pronóstico importante con relación a las posibilidades de control de la lesión tras un tratamiento quirúrgico. Con relación al grado de invasión se han propuesto diferentes clasificaciones. Una de las más utilizadas en las series quirúrgicas actuales es la clasificación de Knosp et al.<sup>110</sup>



**Figura 12.-** RMN hipofisaria. Imagen coronal T<sub>1</sub> con contraste. Macroadenoma hipofisario con invasión de seno cavernoso izquierdo. Grado IV de la clasificación de Knosp et al.<sup>110</sup>

#### 1.5.4.2. ERM <sup>1</sup>H

No existe publicada, hasta donde conocemos, bibliografía relativa a la utilización de espectroscopia por RMN in-vivo en microadenomas hipofisarios. El pequeño tamaño de las lesiones y su proximidad a la base craneal probablemente no permiten realizar estudios fiables en estas lesiones, con la tecnología habitualmente disponible en la actualidad.

Sin embargo sí existen estudios realizados en tumores supraselares, incluyendo grandes macroadenomas, en los que el tamaño lesional permite alejar la ROI de las estructuras óseas de la base craneal y que son tumores relativamente frecuentes.<sup>111, 112</sup> En ellos se estudia la concentración de metabolitos que contienen colina, se correlacionan con datos de proliferación celular (por ejemplo mediante la utilización del anticuerpo monoclonal MIB-1) y se apunta que estos datos podrían aportar información relacionada con el potencial de crecimiento y agresividad tumoral, si bien el pequeño número de casos estudiados no permite obtener conclusiones estadísticamente significativas.

También se han publicado artículos sobre la aplicación de la técnica de espectroscopia por RMN in-vivo en pequeñas series de otros tipo de tumores de la región selar, como por ejemplo craneofaringiomas o en casos clínicos de lesiones poco habituales, como por ejemplo un tuberculoma hipofisario.<sup>113-115</sup>

## 1.5.5 ANATOMÍA PATOLÓGICA

### 1.5.5.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA / ANTECEDENTES

El abordaje quirúrgico a las lesiones selares se inició en la última década del siglo XIX.<sup>116</sup> A medida que este tratamiento quirúrgico de los adenomas hipofisarios se fue generalizando, se hizo evidente que diferentes lesiones que compartían esta localización tenían diferentes características en cuanto a su forma de presentación clínica, dificultad de manejo quirúrgico y frecuencia de complicaciones y evolución postoperatoria. Esto llevó al desarrollo de un interés creciente en el estudio histológico de los adenomas hipofisarios y el establecimiento de una clasificación de los mismos.

Los primeros intentos de clasificación se basaron en la descripción de sus características bajo microscopía óptica, tras realizar técnicas de tinción con hematoxilina y eosina. Esto permitió inicialmente distinguir tres tipos de adenomas hipofisarios, en función de las características de tinción del citoplasma de las células tumorales: acidófilos, basófilos y cromófbos. La correlación de estas características tintoriales con las manifestaciones clínicas correspondientes a cada tipo de adenoma, generalizó un esquema en el que se consideraba a los adenomas acidófilos como secretores de GH y causantes de gigantismo o acromegalia, a los basófilos como secretantes de ACTH y causantes de la enfermedad de Cushing y a los adenomas cromófbos como lesiones hormonalmente inactivas y no asociadas a un tipo específico de endocrinopatía.<sup>116</sup>

Esta clasificación se mantuvo inicialmente durante muchos años, hasta que empezaron a describirse casos de pacientes acromegálicos o afectados de una enfermedad de Cushing que eran portadores de adenomas cromófbos, poniendo así de manifiesto las limitaciones de la misma.<sup>117</sup> En la década de los años 60 y 70 del siglo XX, el desarrollo de técnicas analíticas capaces de medir los niveles séricos de hormonas, de la microscopía electrónica y de las técnicas de inmunohistoquímica, supuso un impulso importante para los estudios de caracterización y clasificación de los adenomas hipofisarios.<sup>118, 119</sup> De manera paralela, los clínicos establecieron criterios anatómicos y funcionales de clasificación de estas lesiones y los patólogos profundizaron en el

estudio de las muestras tumorales, utilizando las nuevas técnicas de investigación a su alcance.

En esta época ganó popularidad la clasificación clínica basada en la funcionalidad de los adenomas hipofisarios. Se estableció entonces una primera división en dos grandes tipos de tumores: adenomas clínicamente funcionantes (aquellos que tenían actividad endocrina por producir una o más hormonas) y adenomas clínicamente no funcionantes (los carentes de dicha actividad). Dentro del grupo de los adenomas funcionantes se estableció a su vez una clasificación de diferentes subtipos en función de la hormona u hormonas que secretaban en exceso, detectadas a través de estudios analíticos (en condiciones basales, a través del análisis de sus ritmos circadianos o tras la realización de tests de estímulo o frenación de la secreción). Se identificaron subtipos tumorales secretores de una sola hormona: adenomas somatotropos (GH), prolactinomas (PRL), adenomas corticotropos (ACTH), adenomas tirotropos (TSH) y adenomas gonadotropos (FSH y LH). Se identificaron también subtipos caracterizados por su patrón de secreción de dos hormonas hipofisarias (GH-PRL, ACTH-PRL, TSH-PRL y FSH-PRL) e incluso hubo descripción de casos de tumores con una secreción plurihormonal.<sup>120</sup> Para los adenomas no funcionantes, la realización de estudios de microscopía electrónica llevó a la descripción de diferentes subtipos en base a sus características ultraestructurales, como la presencia y densidad en el citoplasma de gránulos secretorios o la presencia de cambios oncocíticos.

En 1976, Horvath y Kovacs propusieron una clasificación de los adenomas hipofisarios que tenía en cuenta características clínico-funcionales y características ultraestructurales de estos tumores.<sup>118, 119</sup> El desarrollo posterior de las técnicas inmunohistoquímicas llevó a disponer de herramientas más refinadas que redujeron los fenómenos de reactividad cruzada y la frecuencia de falsos positivos, haciendo sus resultados más fiables y reproducibles.<sup>122</sup> Los estudios de correlación entre los perfiles inmunohistoquímicos de los diferentes tipos de adenomas hipofisarios y sus características ultraestructurales mediante técnicas de microscopía electrónica, permitieron identificar a la gran mayoría de los tumores únicamente en función del uso de la inmunohistoquímica. Esto relegó los estudios de microscopía electrónica (caros y laboriosos) al estudio de casos concretos de tumores plurihormonales o completamente

carentes de reactividad inmunohistoquímica y, en la práctica, a su utilización casi exclusiva en el campo de la investigación.

#### 1.5.5.2. CLASIFICACIÓN ULTRAESTRUCTURAL

##### 1.5.5.2.1. ADENOMAS PRODUCTORES DE GH (SOMATOTROPOS)

###### a) ADENOMAS SOMATOTROPOS DENSAMENTE GRANULADOS

Suelen presentar un patrón difuso de proliferación celular con células de morfología poliédrica y tamaño medio. Este subtipo de adenomas somatotropos se corresponde con los que clásicamente fueron descritos mediante tinción y microscopía óptica como adenomas acidófilos y se consideraron característicos de pacientes acromegálicos.

Con técnicas inmunohistoquímicas presentan una reactividad intensa para GH que suele ser densamente granular y presenta una distribución uniforme por todo el citoplasma celular.<sup>123</sup> Es también frecuente la existencia de positividad para la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glicoproteicas.<sup>124</sup>

Su principal característica desde el punto de vista ultraestructural es la presencia en el citoplasma de abundantes gránulos secretores electrodensos, de tamaño grande y morfología esférica, cuya medida oscila entre 350 y 450 nm. El resto de sus características ultraestructurales son similares a las de las células somatotropas normales, con un aparato de Golgi bien desarrollado, retículo endoplásmico rugoso, núcleo esférico eucromático y nucléolos prominentes.<sup>118</sup>

###### b) ADENOMAS SOMATOTROPOS ESCASAMENTE GRANULADOS

A diferencia de los anteriores, este tipo de adenomas somatotropos suele estar formado por células pequeñas redondeadas con núcleos irregulares. Es habitual en ellos la existencia de un considerable pleomorfismo celular y nuclear, siendo relativamente frecuente la presencia de células gigantes de aspecto atípico. No obstante, esta cierta atipia no se correlaciona con un mayor

potencial de agresividad o malignidad desde un punto de vista clínico. Este subtipo de adenomas somatotropos se corresponde con los casos de adenomas cromóforos que fueron clásicamente descritos en algunos casos de acromegalia.<sup>125</sup>

La inmunorreactividad para GH es habitualmente ligera y focal. Es característica la presencia de cuerpos fibrosos yuxtánucleares, que pueden ser puestos de manifiesto mediante el estudio de su inmunorreactividad frente a citoqueratina.<sup>126</sup>

Desde un punto de vista ultraestructural, las células neoplásicas son diferentes a las células somatotropas normales. Los núcleos son irregulares y presentan múltiples indentaciones. El retículo endoplásmico liso y rugoso es abundante. Los gránulos secretorios son más pequeños, con diámetros de entre 100 y 250 nm<sup>(118)</sup>. Su característica diferencial es la presencia de agregados de filamentos intermedios que se localizan en la zona cóncava de las indentaciones de los núcleos y reciben el nombre de cuerpos fibrosos globulares.<sup>125, 126</sup>

### c) ADENOMAS MAMOSOMATROTROPOS

Es el subtipo tumoral más frecuentemente descrito en la clínica como causa de gigantismo.<sup>125,-127</sup>

Los estudios de microscopía óptica muestran células redondeadas o poliédricas con núcleos también redondeados y un citoplasma intensamente acidófilo. Su patrón de crecimiento puede ser difuso o abigarrado.

La inmunohistoquímica muestra como hallazgo característico una positividad intensa para GH y variable para PRL en el citoplasma las mismas células tumorales. En muchos casos existe también positividad para la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glicoproteicas.<sup>127</sup>

Los estudios de ultraestructura suelen mostrar características similares a las de la célula somatotropa densamente granulada. Como diferencia con esta y

como expresión de diferenciación lactotropa, pueden evidenciarse gránulos secretores pleomórficos (con dimensiones de hasta 1500 nm) y la presencia de fenómenos de exocitosis en localización atípica. La combinación con estudios de inmunohistoquímica, confirma la presencia de GH y PRL en el interior de los mismos gránulos secretores de las células neoplásicas.<sup>128</sup>

#### d) ADENOMAS MIXTOS DE CÉLULAS SOMATOTROPAS Y LACTOTROPAS

Su característica definitoria es la presencia de dos poblaciones distintas de células tumorales, que son somatotropas y lactotropas respectivamente. Esta coexistencia de estos dos diferentes tipos tumorales, puede ponerse de manifiesto ya con los estudios de tinción y microscopía óptica, al observar la presencia en proporciones variables de células tumorales acidófilas (somatotropas) y cromófobas (lactotropas). El estudio ultraestructural muestra por una parte la presencia de células somatotropas densamente granuladas y por otra, la de células lactotropas escasamente granuladas. No obstante, en este tipo de adenomas se ha descrito la existencia de células que representan el espectro morfológico completo, tanto de las somatotropas como de las lactotropas.<sup>129</sup>

El estudio inmunohistoquímico muestra claramente la presencia de reactividad para GH o PRL respectivamente, en las células de cada una de las dos distintas poblaciones celulares.<sup>130</sup>

#### e) ADENOMAS DE CÉLULAS PRECURSORAS ACIDÓFILAS

Se trata de tumores infrecuentes, de tipo monomorfo, que se consideran derivados de la célula precursora común para las somatotropas y las lactotropas y que fueron identificados en base a estudios de características ultraestructurales de adenomas hipofisarios.<sup>131</sup>

Por microscopía óptica se trata de tumores cromófobos con diferente proporción de acidofilia. Están constituidos por células pleomorfas con prominentes nucléolos. Es frecuente la presencia de grandes vacuolas

citoplásmicas que pueden llegar a alcanzar el tamaño de los núcleos celulares y dan al tejido un aspecto característico “en panal de abejas”. Su patrón de crecimiento es por lo general difuso.

Existe inmunorreactividad frente a PRL, pero distinta al patrón de “manchas” yuxtannucleares que se ha descrito como característico de los adenomas lactotropos escasamente granulados y, además, pueden presentar diferentes grados de positividad para GH.

El estudio ultraestructural es imprescindible para el diagnóstico de este subtipo de adenomas hipofisarios. Por microscopía electrónica se identifican gránulos secretores de 150 a 200 nm de diámetro, mostrando fenómenos de exocitosis anómala en los límites laterales de la pared celular. En cualquier caso, el hallazgo ultraestructural considerado patognomónico para el diagnóstico de estos tumores es la acumulación de mitocondrias gigantes (cambios oncocíticos) que se corresponden con las grandes vacuolas, identificables mediante técnicas de microscopía óptica.<sup>125</sup>

#### f) ADENOMAS SOMATOTROPOS PLURIHORMONALES

La naturaleza plurihormonal de algunos tumores hipofisarios se puso de manifiesto a través de la utilización de técnicas de inmunoperoxidasa y de análisis ultraestructural de las células neoplásicas.<sup>132</sup>

Aproximadamente la mitad de los adenomas somatotropos presentan secreción plurihormonal de PRL y de la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glicoproteicas. La siguiente combinación más frecuente es la de los que secretan GH y TSH. No obstante, la mayor parte de estos adenomas se presentan en la clínica como un síndrome de hipersecreción aislado.<sup>133</sup>

Cualquiera de las combinaciones de secreción hormonal previamente descritas indica un origen común en una misma célula precursora que da origen a las diferentes líneas celulares maduras.

#### 1.5.5.2.2. ADENOMAS PRODUCTORES DE PRL (LACTOTROPOS)

##### a) ADENOMAS LACTOTROPOS ESCASAMENTE GRANULADOS

La mayor parte de los adenomas lactotrofos corresponden a este subtipo. Pueden presentar un patrón de desarrollo de tipo difuso o papilar. Algunos de estos tumores tienen un abundante estroma de tejido conectivo. Es frecuente encontrar calcificaciones, bien en forma de calcosferas o bien en forma de cuerpos psamomatosos. Cuando las calcificaciones son muy extensas, la tumoración aparece como una hipófisis “pétrea”.<sup>134</sup> Sus células son de tamaño medio y los núcleos presentan una distribución de la cromatina en “sal y pimienta”. Tras tinción de hematoxilina/eosina son tumores habitualmente cromófobos. Pueden presentar ligera basofilia (generalmente asociada a la presencia de un abundante retículo endoplásmico rugoso) y en ocasiones puede evidenciarse mínima acidofilia.

La evaluación inmunohistoquímica con PRL muestra una disposición característica de tinte granular y yuxtanclear globular que se conoce como patrón de Golgi. Con frecuencia muestran inmunorreactividad frente a las restantes hormonas hipofisarias, con la excepción de la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glicoproteicas.<sup>135</sup>

Ultraestructuralmente se caracterizan por la presencia de un abundante retículo endoplásmico rugoso dispuesto en filas paralelas o volutas y un abundante aparato de Golgi. Los núcleos contienen eucromatina con nucléolos grandes y densos. En el citoplasma se identifican abundantes gránulos secretores con una mezcla entre gránulos inmaduros y maduros, cuyos diámetros oscilan entre 125 y 300 nm (la mayoría entre 200 y 220 nm). La forma de extrusión hacia el espacio extracelular en los márgenes de la célula, a diferencia de la extrusión apical típica, se denomina exocitosis atípica.<sup>136, 137</sup>

##### b) ADENOMAS LACTOTROPOS DENSAMENTE GRANULADOS

Son menos frecuentes que los escasamente granulados. Sus características microscópicas son similares a las de los anteriores pero, con frecuencia, su citoplasma muestra una mayor tinción acidófila. El estudio inmunohistoquímico muestra por una tinción fuerte y difusa de PRL, en contraste con el “patrón de Golgi” que es característico de los adenomas lactotropos escasamente granulados.<sup>125, 135</sup>

La evaluación por microscopía electrónica permite identificar células de morfología oval u oblonga con núcleos poliédricos. Presentan complejos de Golgi bien desarrollados y puede encontrarse un retículo endoplásmico rugoso moderadamente desarrollado y bien organizado. Los gránulos secretorios son numerosos y de mayor tamaño que los encontrados en el tipo anterior, con diámetros que varían entre 300 y 1000 nm (con una media de 500 – 600 nm).<sup>135-137</sup>

#### c) ADENOMAS DE CÉLULAS PRECURSORAS ACIDÓFILAS

Sus características son las descritas en el mismo apartado del grupo de adenomas hipofisarios somatotropos.<sup>131</sup>

#### 1.5.5.2.3. ADENOMAS PRODUCTORES DE TSH (TIROTROPOS)

Sus células son habitualmente irregulares, elongadas y angulosas. Sus bordes son groseros. Su patrón de crecimiento es habitualmente sólido abigarrado y puede a veces identificarse una disposición sinusoidal. Con frecuencia presentan un estroma fibroso y ocasionalmente calcificaciones dispersas que, en raras ocasiones, forman cuerpos psamomatosos.<sup>138</sup> A la tinción de HE son habitualmente cromófobos.<sup>125</sup>

El estudio inmunohistoquímico suele ser positivo para  $\beta$ -TSH y, en la mayoría de los casos, también para la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glicoproteicas.<sup>139, 140</sup>

El estudio ultraestructural muestra células elongadas con un núcleo excéntrico ovalado que confiere a las células un típico aspecto polarizado. Presentan un prominente retículo endoplásmico y aparato de Golgi y también abundantes

lisosomas distribuidos por su citoplasma. Sus gránulos secretores son habitualmente pequeños (150 – 250 nm), variables en cuanto a cantidad y presentan una localización característica en regiones del plasmalema.<sup>129</sup>

#### 1.5.5.2.4. ADENOMAS PRODUCTORES DE ACTH (CORTICOTROPOS)

La mayor parte de estos adenomas hipofisarios se asocian clínicamente con el desarrollo del denominado síndrome de Cushing, caracterizado por el conjunto de efectos de un hipercortisolismo prolongado sobre el organismo.<sup>141</sup> Ocasionalmente aparecen adenomas hipofisarios con inmunorreactividad positiva para ACTH, que se presentan sin evidencia de hipercortisolismo clínico o biológico, son denominados adenomas corticotropos silentes y se consideran una entidad distinta a los adenomas funcionantes.<sup>125, 141, 142</sup>

Histológicamente, la mayoría de los adenomas corticotropos funcionantes presentan una arquitectura sinusoidal con un patrón de crecimiento celular difuso. Son habitualmente basófilos, pero no es raro encontrar tumores cromófbos, sobre todo entre los macroadenomas. En esta población celular suele identificarse un núcleo central.<sup>143</sup>

Inmunohistoquímicamente son fuertemente positivos para ACTH y otros productos de la molécula precursora común proopiomelanocortina (POMC), como  $\beta$ -endorfinas o la hormona estimuladora de los melanocitos (MSH).<sup>144</sup>

Las células corticotropas no tumorales adyacentes a las neoplásicas, muestran una característica acumulación perinuclear de citoqueratina que se conoce como cambios hialinos de Crooke. Se considera secundaria al estado de hipercortisolismo crónico y, además de en las células corticotropas normales suprimidas, ocasionalmente puede verse también en células corticotropas tumorales. En este último caso se habla de adenomas de células de Crooke.<sup>145</sup>

##### a) ADENOMAS CORTICOTROPOS DENSAMENTE GRANULADOS

La mayor parte de las células de adenomas corticotropos clínicamente funcionantes comparten sus características ultraestructurales con las de las células corticotropas normales.<sup>144</sup>

Habitualmente se trata de células anguladas de tamaño medio, con núcleo ovalado y nucléolo prominente. El citoplasma contiene un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado y un aparato de Golgi esférico, moderadamente desarrollado. Presenta también alta densidad de gránulos secretores de entre 150 y 500 nm y es frecuente encontrar agregados de estos gránulos.<sup>144</sup>

Su principal característica diferencial es la presencia de agregados perinucleares de filamentos intermedios de citoqueratina, siendo un hallazgo muy útil en el diagnóstico de estos tumores.<sup>145, 146</sup>

## b) ADENOMAS CORTICOTROPOS SILENTES

### i. SUBTIPO I

Sus características son similares a las de los adenomas corticotropos densamente granulados.<sup>141, 142</sup>

### ii. SUBTIPO II

Presentan características microscópicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales similares a las de las células corticotropas no tumorales.<sup>141, 142</sup>

Estos tumores están compuestos por células pequeñas poliédricas que presentan un menor desarrollo de organelas en su citoplasma. Los gránulos secretores son más menos abundantes y su tamaño es menor (150 . 300 nm). Están ausentes los agregados perinucleares de filamentos intermedios de citoqueratina, descritos para los adenomas córticotropos densamente granulares.<sup>142</sup>

#### 1.5.5.2.5. ADENOMAS PRODUCTORES DE GONADOTROPINAS (GONADOTROPOS)

Se trata de tumores que, desde un punto de vista clínico, suelen clasificarse dentro del grupo de los adenomas hipofisarios no funcionantes, siendo infrecuente que sean diagnosticados en base al desarrollo clínico de una endocrinopatía específica.<sup>147</sup> Esto es debido a que suele tratarse de adenomas hormonalmente inactivos.

El estudio de microscopía óptica muestra generalmente la presencia de células alargadas con un aspecto polarizado y una disposición sinusoidal, con formación de pseudo-rosetas alrededor de los vasos sanguíneos. Pueden identificarse a veces patrones de crecimiento de tipo difuso o papilar. La mayor parte de las células son cromóforas.<sup>148</sup>

La evaluación inmunohistoquímica revela positividad para  $\beta$ -FSH,  $\beta$ -LH y la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glicoproteicas. En ocasiones pueden presentarse áreas diferentes en función de su patrón de inmunorreactividad dentro de un mismo tumor, lo que suele correlacionarse con un patrón de crecimiento también distinto en cada una de ellas.<sup>129</sup>

El estudio ultraestructural muestra células con núcleos eucromáticos uniformes. Los gránulos secretores son de pequeño tamaño (50 – 150 nm). El aparato de Golgi muestra características diferentes en ambos géneros, siendo característico un aspecto “en panal de abejas” en mujeres.<sup>149</sup>

#### 1.5.5.2.6. ADENOMAS “NULL CELL”

Son considerados los verdaderos adenomas no funcionantes y se definen como los formados por células carentes de cualquier actividad hormonal. La frecuencia con que son diagnosticados ha ido decreciendo con el paso de los años, a medida que técnicas de diagnóstico más eficaces han conseguido poner de manifiesto, incluso muy bajas tasas de producción hormonal. Su existencia real se considera

dudosa en la actualidad y se piensa muchos de ellos serían realmente adenomas gonadotropos muy poco funcionantes.<sup>150</sup>

Desde el punto de vista del diagnóstico anatómo-patológico carecerían de cualquier característica de diferenciación celular microscópica específica, inmunorreactividad o variación ultraestructural.<sup>151</sup>

Por microscopía óptica se describen células esféricas con patrón de crecimiento difuso o células oblongas con un patrón papilar o en pseudo-empalizada. Son tintorialmente cromóforas, aunque se ha descrito eosinofilia con relación a tumores que presentan células con cambios oncocíticos (relacionados con presencia de abundantes mitocondrias en su citoplasma). Cuando se identifica la presencia de numerosas células con cambios oncocíticos que constituyen al menos el 30-40% del volumen citoplásmico, se subclasifican como oncocitomas.<sup>152</sup>

Ultraestructuralmente presentan características relacionadas con la ausencia de un proceso activo de síntesis proteica por lo que las organelas relacionadas con el proceso de secreción están poco desarrolladas. Los gránulos secretores son poco numerosos y pequeños (100 – 250 nm).<sup>152</sup>

#### 1.5.5.2.7. ADENOMAS PLURIHORMONALES

Este grupo de adenomas hipofisarios se identifica mediante técnicas de inmunohistoquímica, caracterizándose por la existencia de inmunorreactividad para diferentes hormonas en la misma neoplasia. Se excluyen aquellos tumores que presentan inmunorreactividad frente a diferentes hormonas que puede ser explicada como producto de una sola línea celular precursora, como por ejemplo frente a GH/PRL/TSH/FSH/LH/subunidad  $\alpha$  de hormonas glicoproteicas, o frente a ACTH/derivados de POMC. Se trata de tumores infrecuentes, cuyo desarrollo no sería explicable en función del proceso normal de diferenciación de las células adenohipofisarias.<sup>153</sup>

#### 1.5.5.3 CLASIFICACIÓN DE LA WHO

La vigente clasificación de adenomas hipofisarios de la WHO, define tres tipos principales de tumores: adenoma hipofisario típico, adenoma hipofisario atípico y carcinoma hipofisario.<sup>154</sup>

Los adenomas atípicos son un grupo de adenomas hipofisarios caracterizados por su mayor agresividad clínica, en función de su tendencia a la invasión de estructuras vecinas o por su mayor rapidez de crecimiento y mayor dificultad de control terapéutico. Aunque no existe una clara correlación entre las características anatómo-patológicas de un adenoma hipofisario y su agresividad biológica, se definen como adenomas atípicos aquellos que presentan pleomorfismo, atipia nuclear, elevados índices mitóticos, niveles de Ki 67 e inmunorreactividad frente a la proteína p53 superiores al 3%. Los adenomas que no presentan estas características se clasifican como típicos.<sup>154, 155</sup>

Los carcinomas hipofisarios son lesiones extremadamente infrecuentes. La presencia de metástasis (sistémicas o a nivel de neuroeje), constituye su único criterio diagnóstico. Sus características en cuanto a forma de presentación clínica, patrón de secreción hormonal, tendencia a la invasión local de estructuras adyacentes o respuesta terapéutica, no son diferentes a las de los adenomas hipofisarios benignos. Desde un punto de vista histológico, se ha descrito para estas neoplasias una tendencia a presentar una mayor densidad microvascular, aunque este dato no ha alcanzado un nivel suficiente de significación estadística en los estudios realizados.<sup>156</sup> Con respecto a la expresividad de Ki 67 y p53, también parece ser progresivamente mayor en adenomas atípicos y carcinomas hipofisarios, aunque existen casos en que algunos carcinomas presentan niveles extremadamente bajos. La ultraestructura celular tampoco resulta diferente a la de los adenomas hipofisarios benignos.<sup>154, 155</sup>

Por otra parte, la clasificación de la WHO no tiene en cuenta únicamente estos criterios. Así, se definen una serie de subtipos tumorales al integrar información clínica, bioquímica, radiológica, morfológica, inmunohistoquímica y ultraestructural.<sup>154</sup>

#### 1.5.6. TRATAMIENTO

Los adenomas hipofisarios son, como se ha descrito, un grupo heterogéneo de tumores con una gran variabilidad desde el punto de vista clínico, diagnóstico y terapéutico. El tratamiento más adecuado para cada caso concreto será individualizado y dependerá de características específicas como son su patrón de actividad endocrinológica, tamaño o agresividad biológica y puede ser médico, quirúrgico o radioterápico. Por este motivo, su adecuado manejo requiere un abordaje multidisciplinar, con la participación coordinada de diferentes especialistas (endocrinología, neurocirugía, otorrinolaringología, radiología, oftalmología, anatomía patológica, anestesiología, medicina intensiva, radioterapia, enfermería, etc), con una dedicación preferente a este campo de patología.

Los objetivos del tratamiento de los adenomas hipofisarios son el control de la masa tumoral y la sintomatología compresiva asociada, el control de la enfermedad endocrinológica causada por la lesión (en el caso de tumores funcionantes), la preservación de la reserva hormonal hipofisaria y la prevención de recurrencias tumorales.<sup>81-84, 86-90, 92- 94, 97, 99</sup>

#### 1.5.6.1 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

La cirugía transesfenoidal es el tratamiento de elección para una gran parte de los adenomas hipofisarios.

Consiste en el acceso a la silla turca a través de las fosas nasales y senos paranasales. Para que sea satisfactoria se requiere un abordaje preciso a través de las estructuras anatómicas nasales y de la base del cráneo anterior (suelen utilizarse sistemas de neuro-navegación, que permiten la confirmación computerizada de la localización anatómica en el abordaje, con respecto a un espacio tridimensional calculado sobre una imagen preoperatoria), la obtención de una adecuada visualización del tumor y las estructuras anatómicas sellares a través de un estrecho corredor de trabajo (con microscopia quirúrgica y/o endoscopia), la extirpación del adenoma más amplia posible y la preservación de las estructuras circundantes, incluyendo la glándula hipófisis no tumoral.<sup>157</sup>

Se trata de una técnica quirúrgica que se considera poco invasiva y segura. No obstante, diversos estudios han establecido la conveniencia de que sea realizada por neurocirujanos experimentados (nivel de evidencia 1B), al concluir que una mayor experiencia se correlaciona con una mayor probabilidad de control de enfermedad y con una menor incidencia de déficits endocrinológicos y de morbi-mortalidad global. Aunque no existe una clara definición de la experiencia mínima que se consideraría necesaria para un cirujano hipofisario, en el año 2002, el grupo europeo de consenso para el tratamiento de la acromegalia, estableció tres requisitos: la realización previa de al menos 100 procedimientos de cirugía transesfenoidal, una actividad sostenida con al menos 25 cirugías anuales y la publicación de resultados en revistas especializadas, con sistema de revisión por pares.<sup>86</sup>

Las indicaciones de CTE en adenomas hipofisarios, consensuadas actualmente por la mayor parte de sociedades internacionales de neurocirugía y endocrinología, son las siguientes.

a) Tratamiento de primera elección:

- i. Adenomas hipofisarios no funcionantes y gonadotropinomas, en los que existan síntomas compresivos. También valorable en lesiones asintomáticas mayores de 20 mm de diámetro mayor, con un seguimiento radiológico, en los que se haya objetivado un crecimiento tumoral-<sup>94, 99, 157</sup>
- ii. Somatotropinomas. En adenomas completa o mayoritariamente localizados a nivel selar y para macroadenomas con extensión extraselar que producen síntomas de compresión de la vía óptica. Se recomienda también su utilización para macroadenomas considerados irresecables por su extensión, con el objetivo de reducir la secreción hormonal y mejorar la respuesta al tratamiento médico.<sup>87-90, 157</sup>
- iii. Enfermedad de Cushing. Para microadenomas y macroadenomas, independientemente de su extensión. También se recomienda para situaciones de hipercortisolismo

central o ACTH-dependiente sin imagen de adenoma hipofisario, en los que el cateterismo de senos petrosos muestra una secreción lateralizada (en estos se recomienda la realización de una exploración glandular guiada por los resultados del cateterismo, resección de tejido tumoral en caso de ser localizado o hemihipofisectomía en caso de no haber hallazgos intraoperatorios de tumor hipofisario).<sup>91-93, 157</sup>

iv. Tirotropinomas.<sup>95, 96, 157</sup>

b) Tratamiento alternativo o de segunda línea

- i. Para los prolactinomas el tratamiento de elección es médico, con agonistas dopaminérgicos. La cirugía se considera el tratamiento de segunda línea y está indicada en caso de que no haya respuesta al tratamiento médico o que su administración no sea posible debido a intolerancia o por mala cumplimentación del mismo.<sup>81-85, 157</sup>

Los resultados de la cirugía transesfenoidal con relación al control de enfermedad, son diferentes para distintos tipos de adenomas hipofisarios.<sup>157</sup>

Para adenomas funcionantes, en los que existe una endocrinopatía específica causada por una hipersecreción tumoral de una o más hormonas hipofisarias, el objetivo de la cirugía es la obtención de una resección completa de la lesión, que es imprescindible para poder lograr la remisión de la enfermedad. La posibilidad de obtener una extirpación total de un adenoma hipofisario depende de su tamaño (es mayor para microadenomas que para macroadenomas) y se correlaciona a su vez con su invasividad, no siendo habitualmente posible para aquellos que muestran una afectación significativa de estructuras vecinas (por ejemplo del seno cavernoso, con un grado de Knosp 2 o superior). La probabilidad de remisión en pacientes afectos de acromegalia y sometidos a CTE es de un 80-90% para microadenomas (que son una minoría entre los adenomas somatotropos) y de un 50-60% para macroadenomas. En la enfermedad de Cushing la probabilidad es superior al 90% para microadenomas (los más frecuentes entre los adenomas corticotropos) y de un 50-70% en macroadenomas. En el

tratamiento de prolactinomas, puede conseguir una normalización de cifras de PRL en casos seleccionados, con una probabilidad entre un 70-85% para microadenomas, adenomas quísticos y tumores intraselares. En cualquier caso, incluso en muchos adenomas funcionantes, para los que a priori se sabe que no va a ser posible una resección tumoral completa (incluso en el caso de tumores gigantes invasivos), también se considera que la cirugía está indicada, con el fin de conseguir una cito-reducción que alivie síntomas compresivos y pueda mejorar el resultado endocrinológico con la utilización de otras terapias complementarias.<sup>157, 158</sup>

Por lo que se refiere a adenomas no funcionantes, la obtención de un resultado satisfactorio no implica necesariamente una extirpación completa del tumor, ya que la persistencia de pequeños restos tumorales es compatible con el logro de una mejoría en los síntomas de compresión tumoral (hipofunción hipofisaria y/o alteración del campo visual).<sup>157, 158</sup>

La repetición de una CTE es una alternativa a considerar en situaciones concretas, como persistencia de enfermedad tras un primer abordaje quirúrgico en tumores funcionantes (por lo general para casos con resto tumoral identificado, pero incluso de forma precoz en algunos casos de enfermedad de Cushing, incluso sin imagen tumoral identificable en RMN hipofisaria), persistencia o crecimiento de restos tumorales en localización accesible tras CTE previa o recurrencia de enfermedad (10-25% de casos) tras CTE previa eficaz.<sup>81, 83, 90-92, 94, 99, 157</sup>

Entre las complicaciones de la CTE de adenomas hipofisarios, destacan la aparición de nuevos déficits hormonales hipofisarios y la lesión de estructuras vecinas. La probabilidad de aparición de nuevos déficits hormonales adenohipofisarios es muy variable, con un rango de un 7-20% para centros con un número anual elevado de cirugías hipofisarias. La diabetes insípida por déficit permanente de hormona antidiurética es mucho menos frecuente, con una probabilidad de un 2-7% de los casos. Las complicaciones por daños graves a estructuras paraselares infrecuentes. Por su trascendencia destacan las fistulas de LCR (0,5-4%), meningitis (1-5%), daños a la vía óptica con empeoramiento de la función visual (0,5-3%), lesión de nervios óculo-motores (0,5-3%) y los daños a la arteria carótida interna con algunos casos de hemorragia secundaria severa (0,2-1%). La mortalidad de la CTE de adenomas

hipofisaria es baja, con un rango de 0,2-1,5% (en torno a 0,2-0,4% para centros con mayor experiencia).<sup>157, 159</sup>

#### 1.5.6.2 TRATAMIENTO MÉDICO

##### a) PROLACTINOMAS

El tratamiento médico mediante fármacos agonistas del receptor de la dopamina, es el de primera elección en este tipo de adenomas. Esta terapia es eficaz en la mayoría de los casos para reducir los niveles de prolactina, revertir la sintomatología del paciente, restaurar la función reproductora y reducir el tamaño tumoral.

Los agonistas dopaminérgicos se dividen en dos grupos: los de primera generación, como bromocriptina, pergolide y lisuride y los de segunda generación, como cabergolina y quinagolide.

La cabergolina es el fármaco más frecuentemente utilizado en la actualidad, dado que es el que tiene una relación más favorable entre eficacia y efectos secundarios. La introducción del tratamiento se hace de forma progresiva, iniciándolo a dosis bajas (0,25-0,5 mg, una vez a la semana) que se van incrementando gradualmente si no hay problemas de tolerancia, hasta alcanzar las dosis plenas (dosis media de 0,5 mg dos veces a la semana y hasta un máximo de 3,5 mg a la semana).<sup>81-85</sup>

##### b) ACROMEGALIA

El tratamiento médico de los somatotropinomas es una alternativa de segunda línea, aunque puede plantearse como primera opción en situaciones en las que la cirugía esté contraindicada o sea rechazada por los pacientes y en enfermos de edad avanzada con tumores de pequeño tamaño que no producen síntomas compresivos y que presentan un cuadro clínico y afectación bioquímica leve. También puede plantearse su uso en casos

seleccionados como tratamiento preoperatorio, con el objetivo de mejorar el estado del enfermo antes de CTE.

Los análogos de la somatostatina son los fármacos de primera elección en el tratamiento de la acromegalia. Los actualmente disponibles son: octreótida (actualmente no utilizado por requerir la administración subcutánea de varias dosis diarias), octreótida LAR (administración intramuscular profunda cada 28 días), lanreótida (administración intramuscular profunda cada 10-14 días) y lanreótida gel (administración subcutánea profunda cada 28 días, pudiendo espaciarse hasta una cada 56 días). Estos medicamentos consiguen la reducción de las concentraciones séricas de GH a cifras inferiores a 2,5 µg/L en el 40-50% de los pacientes y normalizan las concentraciones séricas de IGF-1 en alrededor del 40% de los casos. En general se ha descrito además la inducción de una moderada reducción del tamaño tumoral, en aproximadamente el 40% de los enfermos.

Los agonistas dopaminérgicos (fundamentalmente la cabergolina) pueden ser utilizados en caso de ausencia de respuesta al tratamiento con análogos, de forma aislada o en terapia combinada. En general su uso sería más recomendable en casos con elevaciones no muy importantes de niveles séricos de GH e IGF-1, sobre todo si de forma concomitante presentan hiperprolactinemia.

El último tipo de fármacos disponibles para el tratamiento de la acromegalia son los bloqueadores del receptor de GH (antagonistas de GH), siendo el único disponible el pegvisomant. No reducen por tanto la secreción o los niveles séricos de GH ni tampoco el tamaño tumoral, pero pueden bloquear la síntesis hepática de IGF-1, normalizando sus niveles séricos en un alto porcentaje de casos y mejorando con ello la sintomatología de los pacientes.<sup>87-90</sup>

### c) ENFERMEDAD DE CUSHING

Las indicaciones fundamentales del tratamiento médico de la enfermedad de Cushing tiene como objetivo el manejo del hipercortisolismo en las siguientes situaciones: cuando el tratamiento quirúrgico está contraindicado, en el período previo a la cirugía, ante persistencia o recurrencia tras CTE o en la fase en que no se encuentra controlado tras la irradiación de una tumoración.

Para pacientes afectos de un enfermedad de Cushing en los que el tratamiento médico esté indicado, se recomienda la utilización de inhibidores enzimáticos de la síntesis de cortisol a nivel suprarrenal. Entre ellos, el ketoconazol es el fármaco de primera elección. Si no se consigue con ello el control del hipercortisolismo, se sugiere la adición de metirapona (que también puede utilizarse en monoterapia en lugar del ketoconazol). Otra alternativa que se ha utilizado es la adición de mitotane, un fármaco adrenolítico que se ha utilizado en el tratamiento de carcinomas suprarrenales, si bien su uso está limitado por sus frecuentes efectos secundarios.

Por otra parte, se ha recurrido a la opción de utilizar fármacos inhibidores de la síntesis hormonal a nivel hipofisario. Entre los que se han utilizado, destacan por su mayor eficacia la cabergolina y el pasireotido. La cabergolina es un agonista dopaminérgico utilizado en el tratamiento de prolactinomas que ha mostrado también utilidad en la reducción de los niveles de CLU en enfermedad de Cushing. El pasireotido es un análogo de la somatostatina con especial afinidad por los receptores de membrana sst5, que ha sido aprobado en el tratamiento casos seleccionados de enfermedad de Cushing, tras haber demostrado su utilidad en el control del hipercortisolismo. En casos resistentes al tratamiento, se han realizado también estudios con terapias combinadas utilizando cabergolina y pasireotido e incluso añadiendo ketoconazol ante ausencia de respuesta.<sup>91-93</sup>

#### d) TIROTROPINOMAS

Aunque no existe en la actualidad un tratamiento médico específico para los tirotropinomas, se recomienda la utilización de análogos de la somatostatina, tanto preoperatoriamente (para reducir los niveles de hormonas tiroideas) como en el tratamiento de adenomas en los que la CTE no ha conseguido el control de la enfermedad.

El fármaco más utilizado ha sido el octreótido, con el que se han descrito reducciones tanto en los niveles séricos de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, como en el tamaño tumoral. También se han descrito repuestas a tratamientos con lanreótido, con mejoría de los síntomas de hipertiroidismo y disminución de niveles séricos de hormonas tiroideas, pero sin disminución de tamaño tumoral.

Con respecto al control de los síntomas de hipertiroidismo, se han utilizado fármacos beta-bloqueantes como propanolol (80-160 mg/día) o atenolol (25-50 mg/día). La utilización de terapias anti-tiroideas (farmacológicas o de medicina nuclear), se considera sin embargo contraindicada, dado que un descenso prolongado de los niveles séricos de hormonas tiroideas produciría un aumento de los niveles de TSH que podría suponer un estímulo para el crecimiento tumoral.<sup>95</sup>

#### e) ADENOMAS NO FUNCIONANTES Y GONADOTROPINOMAS

Para los adenomas no funcionantes y gonadotropinomas tampoco existe una terapia médica específica de eficacia comprobada. Para ellos se han descrito también reducciones de tamaño tumoral con la utilización de agonistas dopaminérgicos, análogos de la somatostatina y análogos de la GnRH.

Se ha constatado en diferentes estudios la expresión de receptores dopaminérgicos, sobre todo D<sub>2</sub>, en adenomas hipofisarios no funcionantes, lo que sustenta la posibilidad de utilizar agonistas dopaminérgicos en su tratamiento. Con ellos se han publicado resultados favorables en los que se describe una estabilización de tamaño tumoral en aproximadamente un 60% de los casos y una reducción del mismo en un 25% de los pacientes. Con

relación a la afectación de campo visual, se constató una estabilización de la función en un 70% y una mejoría en el 20% de los enfermos tratados. En general se ha recomendado la utilización de la cabergolina frente a otros agonistas de DA, debido a su mayor afinidad de los receptores D<sub>2</sub>.

Las series publicadas de tratamiento con análogos de somatostatina incluyen un escaso número de pacientes y el seguimiento es por lo general corto. Con ello se han descrito reducciones de tamaño tumoral en aproximadamente un 10-20% de los casos y una mejoría de las alteraciones campimétricas en alrededor de un 30% de los enfermos. Se ha apuntado que la presencia de receptores de la somatostatina del subtipo sst2 podría predecir la respuesta a este tratamiento.<sup>99</sup>

Los pocos estudios en que se ha probado la eficacia de los análogos de GnRH, no han mostrado su utilidad en este tipo de adenomas hipofisarios.

Por último, como para todo el resto de subtipos tumorales, está descrita también la utilización de terapias combinadas con los fármacos previamente señalados, con resultados diversos.<sup>94, 99</sup>

#### f) TUMORES INVASIVOS

Para adenomas hipofisarios atípicos con un comportamiento biológico agresivo y mala respuesta a tratamientos de primera y segunda línea y para carcinomas hipofisarios, se ha utilizado la temozolomida (TMZ). Se trata de un fármaco citostático alquilante que provoca la metilación de algunas bases del ADN celular y se ha demostrado en estudios experimentales que la respuesta a su utilización depende de la inmunexpresión de O<sup>6</sup>-metilguanina ADN metil transferasa (MGMT). Aunque no existen datos que permitan obtener conclusiones definitivas, se ha observado una respuesta eficaz tras tratamiento con TMZ en algunos pacientes afectados de adenomas hipofisario agresivos y resistentes a tratamientos previos.

Otros fármacos dirigidos a diferentes dianas terapéuticas como anti-VEGF o inhibidores m-TOR, pueden ser también potencialmente útiles en el tratamiento de este subtipo de adenomas hipofisarios.<sup>109, 160</sup>

### 1.5.6.3 TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO

A pesar de que los adenomas hipofisarios son tumores benignos, la radioterapia sigue teniendo un papel en el tratamiento de casos seleccionados. La radioterapia externa convencional, utilizada en las series más antiguas, ha sido sustituida por técnicas sofisticadas, basadas en estudios de imagen más exactos y avances técnicos en la focalización de los campos de irradiación, que permiten la irradiación más selectiva de las lesiones, mejorando los resultados de los tratamientos, a la vez que minimizan sus efectos secundarios.<sup>161-164</sup>

En la actualidad la fuente de radiación puede ser un acelerador lineal (es una fuente de fotones y es el sistema más frecuentemente utilizado por su amplia disponibilidad), Gamma Knife (utiliza radiación gamma proveniente de Cobalto-60), CyberKnife (basado en un acelerador lineal compacto montado en un brazo robotizado) o un ciclotron (genera protones y su disponibilidad es limitada debido al alto coste de las instalaciones).

En función de la forma de tratamiento, puede realizarse una radioterapia estereotáxica fraccionada, en la que se administra una alta dosis de radiación repartida en pequeñas dosis diarias (habitualmente cinco dosis semanales durante seis semanas), o bien una radiocirugía, en la que se administra una sola dosis de radiación de alta intensidad, utilizando un sistema que permite focalizar la zona de máxima dosificación en un pequeño volumen de tejido, y se minimiza la dosis recibida por los tejidos circundantes.

Se aconseja utilizar la radiocirugía en el caso de adenomas hipofisarios de pequeño tamaño (menores de 3 cm de diámetro mayor), que se encuentran suficientemente alejados del quiasma óptico (al menos 3-5 mm). Para lesiones de mayor tamaño o que contactan con la vía óptica, se considera preferible utilizar la radioterapia estereotáxica fraccionada.

En general se considera que cualquiera de las técnicas de radioterapia descritas tiene un alto nivel de eficacia con relación al control del crecimiento tumoral, consiguiendo estabilizar o reducir su volumen en prácticamente el 90% de los casos tratados. En tumores funcionantes también puede conseguir la reducción de la hipersecreción hormonal, aunque este efecto es variable y habitualmente tardío, consiguiendo la normalización en aproximadamente un 50% de los casos, al cabo de 10 años. Por otra parte y a pesar de que se intenta reducir al mínimo la irradiación del hipotálamo y, en caso de tumores lateralizados, del tejido hipofisario normal, la aparición de hipopituitarismo como consecuencia del tratamiento tiene lugar en al menos un 30% de los pacientes al cabo de 10 años.<sup>161, 162</sup>

Los efectos secundarios y complicaciones de la radioterapia no son frecuentes, aunque ocasionalmente pueden ser importantes. La probabilidad de daño para las estructuras de la vía óptica utilizando técnicas de radioterapia estereotáxica fraccionada es de aproximadamente 0,8-1,3% de casos a los 10 años o de un 1,5% a los 20 años (el riesgo se minimiza si la dosis total es menor de 54 Gy), mientras que es incluso inferior utilizando radiocirugía, si la dosis máxima que reciben estas estructuras es inferior a 10 Gy. El riesgo de daño para los nervios craneales vecinos es bajo, aunque se ha descrito como más probable en casos de re-irradiación. Por último, la probabilidad de aparición de neoplasias secundarias es inferior al 2% a los 20 años del tratamiento.<sup>163</sup>

Con todo ello, la radioterapia se considera una medida de último recurso en el tratamiento de los adenomas hipofisarios, aplicable en aquellos casos en que se consideran agotadas las alternativas médicas y quirúrgicas (nivel de evidencia 2C).

En el tratamiento radioterápico de adenomas hipofisarios no funcionantes, las dosis recomendadas son de 18 Gy (14-20 Gy) con un máximo de 8-10 Gy para la vía óptica en el caso de la radiocirugía, o de 45-54 Gy (con un fraccionamiento de 1,8 Gy/sesión), con un máximo de 54 Gy para la vía óptica, en el caso de la radioterapia estereotáxica fraccionada.

Para adenomas funcionantes el objetivo del tratamiento es conseguir el control bioquímico de la endocrinopatía, además del control del crecimiento tumoral, por lo que

las dosis requeridas de irradiación suelen ser mayores. Las dosis recomendadas para la radiocirugía en estos pacientes son de 20 Gy (20-25 Gy), sin exceder 8-10 Gy para la vía óptica. En el caso de utilizar radioterapia estereotáxica fraccionada, se sugieren dosis similares a las que se administran para adenomas no funcionantes.<sup>164</sup>

## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO. OBJETIVOS



## 2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO. INTERÉS DE LA TESIS

El conocimiento de las características espectrales de muestras de tejido intacto, analizados por técnica de espectroscopia ex vivo mediante HR-MAS, sobre muestras de biopsia de adenomas hipofisarios intervenidos quirúrgicamente, puede permitir conocer su perfil metabólico e identificar metabolitos que puedan ser utilizados como biomarcadores útiles para el diagnóstico, estadiaje y clasificación de los mismos.

El interés científico-médico de este proyecto de investigación radica en la descripción, no realizada hasta el momento actual, del perfil metabólico de adenomas hipofisarios, a través del estudio de muestras intactas de tejido tumoral, mediante la técnica de HR-MAS.

La descripción del perfil metabólico pretende lograr la identificación de los diferentes metabolitos que intervienen en el proceso biológico que tiene lugar en el tejido tumoral, para posteriormente seleccionar cuales son los que pudieran ser relevantes, identificándolos y, si es posible, cuantificándolos. Mediante la correlación estadística entre los resultados del estudio experimental y las variables demográficas, clínicas, radiológicas e histopatológicas, se aspira a identificar metabolitos que puedan utilizarse como biomarcadores específicos de adenomas hipofisarios.

Son numerosos los campos de investigación biomédica en los que se ha aplicado el estudio de los perfiles metabólicos de procesos biológicos y entre ellos destacan el desarrollo de nuevos fármacos, la detección y selección de nuevas sustancias activas, la medida de los cambios metabólicos generados por estas sustancias en modelos animales y/o humanos, la medida de la toxicidad sustancias y de su efecto de una sustancia sobre la salud de determinadas poblaciones, la monitorización de intervenciones nutricionales, la monitorización y control evolutivo de la posible aparición de fenómenos de rechazo tras la realización de un trasplante de órganos, la detección de factores de riesgo para el desarrollo de determinadas enfermedades en una población o el diagnóstico y estratificación de enfermedades (metabólicas, degenerativas, tumorales, etc), a través de la identificación de biomarcadores.

En la actualidad, la identificación de biomarcadores se sitúa como una prioridad no solo en la investigación biomédica y en la agenda principal de las autoridades regulatorias, sino también desde el punto de vista industrial. Así, los biomarcadores se han convertido en una parte esencial del desarrollo clínico, porque potencialmente ofrecen un camino más rápido al mercado, en contraste con el enfoque tradicional para el desarrollo de métodos diagnósticos y/o terapéuticos.

Los adenomas hipofisarios son un tipo tumoral interesante como objeto de estudio, dada su elevada frecuencia de presentación en el ámbito clínico y sus características y variabilidad biológica, lo que hace de su manejo un problema complejo que requiere un enfoque especializado multidisciplinar. La traslación a la clínica de la descripción de su perfil metabólico, podría tener potencial relevancia al aportar una información que podría incorporarse como una herramienta adicional a los protocolos de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de estos tumores:

- a) La identificación de biomarcadores moleculares a partir de muestras tisulares de diferentes tipos de adenomas hipofisarios, puede ser de gran utilidad desde el punto de vista diagnóstico: diagnóstico diferencial frente a otros tipos tumorales con los que comparten localización, diagnóstico diferencial entre los diferentes tipos de adenomas hipofisarios (no funcionantes frente a los diferentes tipos de adenomas funcionantes) o incluso definición de subtipos tumorales (por ejemplo dentro del grupo de los adenomas no funcionantes). También en el campo del diagnóstico, una vez identificados biomarcadores relevantes y en unión con los avances técnicos en el campo de la RMN, sería posible avanzar en la aplicación de procedimientos no invasivos de estudio del perfil metabólico de adenomas hipofisarios, como la espectroscopia in vivo mediante RMN.
- b) Además de los aspectos diagnósticos apuntados, pueden ser útiles desde un punto de vista pronóstico o predictivo y en la monitorización y seguimiento de los pacientes: identificación de tumores con un patrón agresivo de crecimiento o evaluación, toma de decisiones terapéuticas o monitorización de resultados de tratamiento.

- c) Por último puede plantearse su utilización como elementos relevantes en la toma de decisiones terapéuticas, como pudiera ser el apoyo a la hora decidir sobre la elección entre un tratamiento médico o quirúrgico a un paciente.



## 2.2. OBJETIVOS.

El objetivo general del presente estudio es la descripción del perfil metabólico de adenomas hipofisarios, utilizando la técnica experimental de espectroscopia “ex-vivo” mediante resonancia magnética de alta resolución con rotación al ángulo mágico (RMN-HR-MAS), realizada sobre muestras intactas de tejido, obtenidas de adenomas hipofisarios intervenidos quirúrgicamente.

Como consecuencia del desarrollo del trabajo de investigación propuesto, se espera obtener los siguientes objetivos específicos:

- a) Asignación de las señales o resonancias correspondientes a los perfiles metabólicos de los espectros HR-MAS, a las muestras de biopsia de los diferentes subtipos de adenomas hipofisarios.
- b) Identificación del conjunto de metabolitos detectables mediante HR-MAS, para las muestras de cada uno de los subtipos clínicos de adenomas hipofisarios estudiados.
- c) Análisis diferencial cualitativo entre los perfiles metabólicos de los distintos subtipos clínicos de adenomas hipofisarios estudiados.
- d) Correlación entre las diferencias de perfil metabólico cuantitativo de los distintos subtipos clínicos de adenomas hipofisarios estudiados y las correspondientes variables demográficas, clínicas, radiológicas e histopatológicas de los pacientes.
- e) Diferenciación cuantitativa estadística de la composición del perfil metabólico, entre los diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios estudiados.
- f) Determinar la sensibilidad y la especificidad del análisis RMN HR-MAS como método de diagnóstico metabólico diferencial entre diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios

- g) Propuestas relativas a la traslación a la práctica clínica, del conocimiento obtenido acerca del perfil metabólico de muestras intactas de adenomas hipofisarios, estudiadas mediante la técnica RMN HR-MAS.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1. SELECCIÓN DE CASOS

El estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario de La Ribera y se obtuvo la firma del correspondiente consentimiento informado por parte de los pacientes. Se incluyeron un total de 58 muestras intactas de adenomas hipofisarios, procedentes de enfermos que fueron intervenidos por el autor en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de La Ribera, entre 2009 y 2013.

En todos los casos se realizó un abordaje microquirúrgico transeptal transesfenoidal. El objetivo de la cirugía fue conseguir la máxima resección tumoral posible y la preservación anatómica de la glándula hipófisis. En el momento de la cirugía se obtuvieron para cada uno de los tumores, muestras que fueron remitidas al servicio de Anatomía Patológica para su estudio y diagnóstico histopatológico. Por otra parte, el tejido excedente fue inmediatamente introducido para su conservación, en un ultracongelador a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- a) Muestras intactas de tejido de tumores hipofisarios, diagnosticados clínica y radiológicamente y estudiados histopatológicamente por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de La Ribera.
- b) Diagnóstico clínico/endocrinológico preoperatorio de prolactinoma, adenoma no funcionante, acromegalia (somatotropinoma), enfermedad de Cushing (corticotropinoma) o tirotropinoma. Para los diferentes subtipos de adenomas funcionantes se utilizaron los criterios diagnósticos estándar aceptados internacionalmente en el momento del diagnóstico (reseñados previamente en el apartado de introducción)

#### 3.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- a) Casos en que el volumen de la muestra tumoral resultó insuficiente para la realización de la técnica HR-MAS.



## 3.2. VARIABLES DE ESTUDIO

### 3.2.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS

- 3.2.1.1. Fecha de nacimiento.
- 3.2.1.2. Edad del paciente (en el día de la intervención quirúrgica).
- 3.2.1.3. Género.

### 3.2.2. VARIABLES CLÍNICAS

- 3.2.2.1. Clasificación de los subtipos clínicos de adenomas hipofisarios, en función de su patrón de secreción hormonal
  - a) Prolactinomas.
  - b) Adenomas no funcionantes.
  - c) Acromegalia (somatotropinomas).
  - d) Enfermedad de Cushing (corticotropinomas).
  - e) Tirotropinomas.
- 3.2.2.2 Agresividad tumoral en función de su ritmo de crecimiento.

### 3.2.3. VARIABLES RADIOLÓGICAS

- 3.2.3.1. Tamaño tumoral
  - a) Microadenomas: diámetro mayor en RM hipofisaria (planos coronal o sagital) hasta 10 mm.
  - b) Macroadenomas: diámetro mayor en RM hipofisaria (planos coronal o sagital) mayor de 10 mm.
- 3.2.3.2. Invasividad local
  - a) Invasión del seno cavernoso, valorada por la clasificación de Knosp.<sup>110</sup>
  - b) Invasión del seno esfenoidal.
  - c) Extensión supraselar.

### 3.2.4. VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS

3.2.4.1. Diagnóstico histopatológico.

3.2.4.2. Perfil inmunohistoquímico: determinación semi-cuantitativa (porcentual) de la expresividad para las siguientes hormonas:

- a) Hormona de crecimiento (GH).
- b) Hormona adrenocorticotropa (ACTH).
- c) Hormona folículo estimulante (FSH).
- d) Hormona luteinizante (LH).
- e) Hormona tirotrópica (TSH).

3.2.4.3. Índices de proliferación tumoral: determinación porcentual de la expresividad para:

- a) Ki67.
- b) p53.

### 3.3. TÉCNICA EXPERIMENTAL

#### 3.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LOS ESTUDIOS EX VIVO

Las muestras sólidas de los adenomas hipofisarios obtenidas durante la intervención quirúrgica realizada a cada paciente, fueron inmediatamente conservadas en un ultracongelador (-80°C) hasta el comienzo del protocolo de extracción de las muestras experimentales.

El tiempo total de preparación para cada muestra, previo al proceso de adquisición de RMN fue inferior a 5 minutos. Se procedió a enfriar todo el material que iba a estar en contacto con el tejido, con el objeto de reducir al máximo su posible degradación durante este periodo de tiempo. Las muestras se extrajeron del ultracongelador e inmediatamente se introdujeron en un crio-vial con N<sub>2</sub> líquido. El tejido que se utilizó en el estudio mediante HR-MAS se troceó del conjunto total de la pieza tumoral, estando sumergido en N<sub>2</sub> líquido. Cada muestra, sin previo lavado con D<sub>2</sub>O, se introdujo en un rotor de 4 mm de ZrO<sub>2</sub>, previamente enfriado, en el que estaba encajado un recipiente cilíndrico de 50 ml de volumen y se procedió a su pesaje. El valor promedio del peso de las muestras de tejido estudiadas fue de 22,8 mg (3,9-44,6). Posteriormente se rellenó el rotor con D<sub>2</sub>O frío y, tras eliminar el excedente, se procedió a su sellado.

#### 3.3.2. INSTRUMENTACIÓN Y SECUENCIAS DE ADQUISICIÓN HR-MAS

##### a) Aparataje para la realización de la técnica HR-MAS:

La adquisición se realizó en espectrómetros Bruker Avance, del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de Valencia.

Para todas las muestras se utilizó un espectrómetro Bruker Avance DRX 600, operando a una frecuencia 1H de 600,13 MHz, equipado con una sonda HR-MAS de triple resonancia (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N),

con gradientes de campos magnéticos alineados con el eje del ángulo mágico.

Adicionalmente, para 11 de las muestras estudiadas, se utilizó un espectrómetro Bruker Avance DRX 500, operando a una frecuencia de  $^1\text{H}$  de 500,13 MHz, equipado con una sonda HR-MAS de triple resonancia ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ), con gradientes de campos magnéticos alineados con el eje del ángulo mágico.

La homogeneidad del campo magnético se verificó mediante un proceso de ajuste de las bobinas de “shimming”, usando el experimento 1D con presaturación de la línea de  $\text{H}_2\text{O}$  en un modo interactivo. El doblete de la Alanina (Ala) a 1,475 ppm, se utilizó como método de control del ajuste del campo magnético.

b) Protocolo de adquisición:

Para todas las muestras se adquirió un experimento con un pulso simple de  $90^\circ$ , secuencia 1D PRESAT (pulso y adquisición) para obtener los perfiles metabólicos.

En todos los experimentos se recogieron 256 repeticiones con 32 k puntos de datos. Con el fin de suprimir la señal del disolvente, la duración de la presaturación de la señal del agua fue de 1 s durante el proceso de reciclado. La anchura espectral fue de 8 y 10 kHz para los espectrómetros de 600 y 500 MHz, respectivamente. Con el fin de mantener las bandas de rotación fuera de las ventanas de adquisición, las muestras se giraron a 5000 MHz en el espectrómetro DRX 600 y a 4000 MHz en el espectrómetro DRX 500. La temperatura de la muestra se mantuvo a  $273^\circ\text{K}$ , usando como método de refrigeración los tubos de presión de gas utilizados para hacer girar la muestra. Este valor de temperatura fue medido por el termopar localizado inmediatamente debajo del rotor y, el efecto de rotación de la muestra, indujo un ligero incremento del mismo. Medidas internas que se obtuvieron utilizando

una muestra 100% de metanol en un rotor de 4 mm, girando a la misma frecuencia, proporcionaron un valor de temperatura más correcto (277° K). Con el fin de minimizar los efectos de degradación del tejido que podrían alterar la composición metabólica del material de biopsia, todos los espectros ex-vivo se adquirieron a una temperatura de 277° K. Para asegurar una estabilización de la temperatura, se empleó un tiempo total de 10 minutos, previo al proceso de adquisición de los espectros. El tiempo total de reciclado fue de 1,5 s en todos los experimentos.

Previo a las transformadas de Fourier, el decaimiento libre de la señal (FID) se multiplicó por una línea exponencial de ensanchamiento de 0,3 Hz.

Como referencia para el desplazamiento químico se usó la señal del metilo (CH<sub>3</sub>) de Ala 1,475 o, alternativamente, del CH<sub>3</sub> del Lactato (Lac) a 1,33 ppm.

Con el fin de reducir las potenciales distorsiones originadas por la presencia de compuestos macromoleculares tipo proteínas y/o lípidos, también se adquirieron espectros 1D CPMG (Carr-Purcell-Meilboom-Gill) y NOESY (“nuclear Overhauser effect spectroscopy”). La secuencia 1D CPMG consiste en una secuencia de pulso [90-( $\tau$  - 180 -  $\tau$ )<sub>n</sub> adquisición] también con presaturación la señal del agua y de duración de unos 14 minutos usando un tiempo de adquisición de 2,18s con una anchura espectral de 10 kHz, con un total de 256 repeticiones y un tiempo de relajación de 1s. El intervalo entre pulsos ( $\tau$ ) se ajustó a 1,1 ms y n a 8. La secuencia CPMG se ha usado como filtro T<sub>2</sub>, con el fin de eliminar las resonancias anchas de moléculas grandes como lípidos, que pueden afectar la línea base. La secuencia de pulso para los experimentos 1D NOESY es del tipo [90 -  $\tau$  - 90], con  $\tau$  = 100 ms el tiempo total de adquisición, la anchura espectral, el número de repeticiones y el tiempo de relajación fueron idénticos a los utilizados en el experimento CPMG.

Con el propósito de asignación e identificación del máximo número de metabolitos, para el grupo de 10 muestras tumorales para las que se disponía de una cantidad de tejido suficiente, también se obtuvieron espectros bidimensionales (2D) homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY (espectroscopia de correlación total) y heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (transferencia cuántica sencilla  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )<sup>22,-24</sup>. El experimento bidimensional (2D)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY se obtuvo usando la secuencia de mezcla DIPSI-2ESGPPH para conseguir la transferencia homonuclear Hartman-Hahn con un tiempo de adquisición de 170 ms, 50 ms de bloqueo de espines, una anchura espectral de 10 kHz y un tiempo de relajación de 1,5. Se acumularon 32 repeticiones como promedio para cada una de los 256 incrementos durante  $t_1$ , con un tiempo total de adquisición de 2 h. Los datos fueron rellenados con ceros en una matriz de 2k x 512 y multiplicada por una función tipo seno cuadrado desplazada previa a la aplicación de las transformadas de Fourier. Los experimentos 2D heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  gradiente HSQC PHPR se han obtenido utilizando para la selección del gradiente el tipo eco-antieco para la detección en modo sensible a la fase, usando un tiempo de adquisición de 170 ms con la secuencia GARP para la modulación del desacoplamiento del  $^{13}\text{C}$  y 1 s de tiempo de relajación. Se promediaron un total de 128 repeticiones para cada uno de los 256 incrementos de  $t_1$ , correspondiendo a un tiempo total de acumulación de 21 h. Se han usado dos pulsos gradiente tipo seno de fuerza de 40 y 10.05 G/cm con el fin de detectar los protones ( $^1\text{H}$ ) unidos a los núcleos de  $^{13}\text{C}$ . Los datos fueron llenados con ceros hasta completar una matriz de 2k x 1k y multiplicados por una función seno cuadrado desplazada previa al proceso de transformadas de Fourier.

### 3.4. MÉTODO ESTADÍSTICO

Los datos de las variables demográficas, clínicas, radiológicas e histopatológicas se obtuvieron de la historia clínica electrónica utilizada en el Hospital Universitario de La Ribera (“software” SIAS<sup>®</sup>, Ribera Salud II UTE, Alzira, Comunidad Valenciana, España) y se introdujeron en un archivo de una hoja de cálculo Excel, versión de 2003. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 21.0 para Windows (Released 2012. Armonk, NY: IBM Corp). Las variables categóricas se describieron como porcentajes, y las variables cuantitativas se expresaron como el valor central, media, y las medidas de dispersión desviación estándar y el intervalo de confianza de 95%.

Para el análisis bivariante se utilizó la prueba de t de Student en variables dicotómicas y ANOVA de un factor en variables politómicas, para la comparación de medias. Para las proporciones se emplearon la prueba de chi-cuadrado de Pearson y la tendencia lineal de Mantel-Haenszel.

Para el análisis estadístico chemométrico, se procesaron todos los espectros usando el programa TopSpin 1.5 (Bruker Biopsin GmbH, Rheinstetten, Germany) y se transfirieron a MATLAB (MathWorks Inc, 2006), mediante el uso de programas propios para el análisis de los datos. Se investigó especialmente la región de desplazamientos químicos entre 0,50 y 4,70 ppm (región alifática). Los espectros se normalizaron al área total de la región alifática, eliminando con ello las posibles diferencias tanto en el peso de la muestra como en contenido de tipo de tejido. Los espectros fueron descompuestos en tramos de 0,01 ppm y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando programas de MATLAB propios, así como el análisis estadístico multivariante “library23” de PLSTToolBox. Las señales pertenecientes al conjunto de metabolitos seleccionados se integraron y cuantificaron usando un conjunto de rutinas de MATLAB propias y semiautomáticas para el ajuste de picos.

Asimismo, el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante por proyección de estructuras latentes (PLS-DA) se aplicaron para

el conjunto de datos de los espectros de RMN. La construcción de ambos modelos se ha realizado mediante el uso de la herramienta PLS Toolbox 5.0 (Eigenvector Research, WA, USA) para MATLAB<sup>®</sup>. PCA es capaz de encontrar incrustaciones de baja dimensionalidad en datos multivariantes, de tal manera que mantiene de manera óptima la estructura de los datos<sup>20</sup>. La técnica PCA transforma las variables en un conjunto de datos, en un número pequeño de nuevas variables latentes denominadas componentes principales (PCs), que no se correlacionan entre sí y que explican el descenso de las proporciones de las varianzas totales de las variables originales. Cada nueva PC es una combinación lineal de la variación original tal que se origina una descripción compacta de la variación dentro del conjunto de datos. A las observaciones se asignan puntuaciones de acuerdo con la variación medida por el componente principal, con aquellas que tienen puntuaciones similares agrupadas entre sí.

Cuando PCA se mostró inadecuado para definir una agrupación, se utilizó la aproximación supervisada. PLS-DA es una extensión supervisada de PCA usada para distinguir dos o más clases, mediante la búsqueda de las variables (matriz X) que están correlacionadas con un miembro de una clase (matriz Y). En esta aproximación los ejes se calculan para maximizar la separación de clases y puede ser usada para examinar la separación que podría existir de otra manera, a través de tres o más componentes principales.<sup>165</sup>

## 4. RESULTADOS



De los 58 casos estudiados, 33 fueron mujeres (56,9%) y 25 fueron hombres (43,1%). El diagnóstico endocrinológico fue de adenoma hipofisario no funcionante en 21 casos (36,2%), acromegalia en 17 (29,3%), enfermedad de Cushing en 15 (25,9%), prolactinoma en 4 (6,9%) y tirotropinoma en 1 (1,7%).

La edad media en el momento de la cirugía fue de 47,72 años (rango: 21,5 - 82,5), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes subtipos de adenomas hipofisarios objeto de estudio. La edad media en el momento de la cirugía fue de 36 (21,5 - 53,5) para los casos de prolactinoma, 57,9 (23,5 - 82,5) para los adenomas hipofisarios no funcionantes, 46,02 (26,5 - 71,5) para la acromegalia, 40,16 (21,5 - 68,5) para los casos de enfermedad de Cushing y 22,5 para el único tirotropinoma,  $p < 0,001$ .

El diagnóstico de neuroimagen se basó en los resultados de una RM hipofisaria realizada sin y tras la administración de contraste paramagnético y con estudio dinámico. En 57 de los casos (98,3%) el diagnóstico fue de adenoma hipofisario. En el caso restante, diagnosticado de una enfermedad de Cushing, no existía imagen tumoral. En función de su tamaño, en 45 casos (77,6%) se diagnosticó un macroadenoma hipofisario, en 12 (20,7%) un microadenoma y en 1 (1,7%) no se identificaba imagen tumoral.

El grado de invasión tumoral del seno cavernoso fue descrito en base a los grados de la clasificación de Knosp<sup>110</sup>: grado 0 en 23 casos (39,7%), grado 1 en 12 casos (20,7%), grado 2 en 9 casos (15,5%), grado 3 en 8 casos (13,8%) y grado 4 en 6 casos (10,3%), sin que se obtuviesen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios. En 11 casos (20%) existía invasión del seno esfenoidal. 30 tumores (51,7%) tenían extensión supraselar. En 4 casos (6,9%) se detectó la existencia de imagen de hemorragia intratumoral, con diagnóstico radiológico de apoplejía hipofisaria.

El estudio histopatológico diagnosticó un adenoma hipofisario en 54 casos (93,1%). En los restantes, el diagnóstico fue de tejido hipofisario normal en 3 casos (5,2%) y de necrosis en 1 caso (1,7%). Los tres casos diagnosticados como tejido

hipofisario normal eran adenomas hipofisarios funcionantes. Dos de ellos eran microadenomas con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing. El restante era un macroadenoma con diagnóstico clínico de acromegalia. El caso diagnosticado de necrosis correspondía a un macroadenoma hipofisario no funcionante.

Siete casos (12.01%), cuatro con diagnóstico de acromegalia, dos de enfermedad de Cushing y un prolactinoma, fueron diagnosticados de adenomas hipofisarios atípicos de acuerdo con la vigente clasificación de la WHO, por presentar inmunorreactividad superior al 3% frente a Ki 67 o p53, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes subtipos de adenomas hipofisarios. No hubo ningún caso de carcinoma hipofisario. Los adenomas hipofisarios atípicos fueron más frecuentes entre aquellos adenomas que presentaban una mayor invasión del seno cavernoso desde un punto de vista radiológico (21,4% para adenomas con grados 3 y 4 de Knosp), frente a los que no la presentaban (11,4% para adenomas con grados 0,1 y 2 de Knosp), aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística.

Los resultados del diagnóstico clínico y anatomo-patológico, así como los datos semi-cuantitativos (porcentuales) de la inmunohistoquímica, se detallan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.-** Datos generales. Diagnóstico clínico: prolactinoma (1), adenoma no funcionante (2), acromegalia (3), enfermedad de Cushing (4) y tirotrpinoma (5). Diagnóstico anatomo-patológico: adenoma hipofisario (1), necrosis (2) o tejido hipofisario normal (3). Resultados semi-cuantitativos (porcentuales) de la inmunohistoquímica frente a hormonas hipofisarias (prolactina, GH, ACTH, FSH, LH y TSH) e índices de proliferación celular (Ki67 y p53).

NUMERO DE CASO	DIAGNOSTICO CLINICO	DIAGNOSTICO ANATOMO PATOLOGICO	IHQ PRL	IHQ GH	IHQ ACTH	IHQ FSH	IHQ LH	IHQ TSH	Ki 67	p53
1	2	1	0	15	0	0	0	0	1	0
2	4	1	75	75	95	50	25	10	1	3
3	3	1	75	95	10	10	10	0	1	1
4	4	1	5	10	95	1	5	5	1	0
5	3	1	20	90	25	1	0	0	1	1

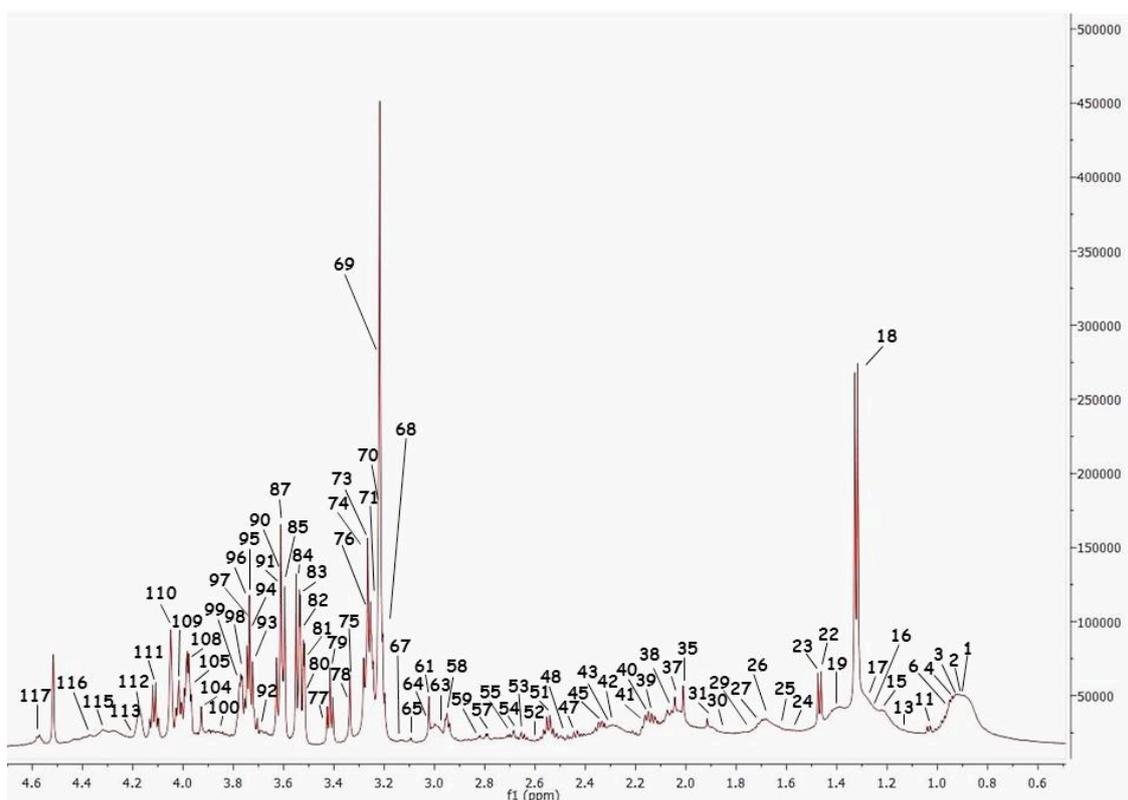
6	2	1	10	5	20	5	5	1	1	3
7	2	1	5	5	5	2	2	2	1	0
8	3	1	1	90	10	1	1	1	2	1
9	2	1	10	20	10	50	1	0	1	1
10	3	1	5	95	5	1	0	5	1	0
11	4	1	25	25	100	20	0	10	5	0
12	4	1	100	100	5	0	0	0	2	1
13	3	1	100	100	0	0	0	0	1	0
14	3	1	0	100	0	0	0	0	1	1
15	4	1	50	100	100	0	0	0	0	0
16	3	1	100	100	0	0	0	0	1	1
17	3	1	10	25	0	0	0	0	1	0
18	4	1	10	100	25	0	0	0	1	0
19	4	1	0	90	0	0	0	0	7	1
20	4	1	75	75	20	0	0	0	4	2
21	4	1	0	0	5	0	0	0	1	0
22	3	1	10	100	0	0	0	0	1	25
23	3	1	100	100	0	0	0	0	5	10
24	3	1	5	100	0	0	0	0	0	1
25	4	1	0	50	20	0	0	0	2	1
26	5	1	1	25	0	0	3	1	3	3
27	4	1	5	40	20	0	0	0	1	0
28	3	1	5	50	0	0	0	0	1	5
29	2	1	0	0	0	0	0	0	2	0
30	2	1	0	1	0	10	0	0	1	0
31	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0
32	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0
33	2	1	0	5	0	0	0	0	1	0
34	2	1	1	0	0	5	0	0	1	0
35	2	1	5	0	0	0	0	1	1	0
36	3	1	0	100	0	0	0	0	1	0
37	4	1	0	100	4	0	0	0	2	0
38	3	1	0	100	0	0	0	0	10	2

39	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0
40	2	1	0	10	0	0	0	0	2	1
41	2	1	1	0	0	30	0	0	3	1
42	4	1	95	95	0	95	95	50	1	1
43	3	1	2	50	1	0	0	0	2	0
44	3	1	100	75	75	0	0	25	2	1
45	2	1	30	50	75	0	0	0	1	0
46	2	1	0	0	0	0	0	0	1	2
47	2	1	0	0	100	0	0	0	1	0
48	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
49	2	2								
50	1	1	95	20	0	0	0	0	0	0
51	4	3	30	75	50	20	50	20	2	1
52	2	1	20	0	0	0	0	0	1	1
53	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0
54	1	1	100	95	0	0	0	0	15	5
55	1	1	100	50	0	0	0	0	2	1
56	1	1	0	75	20	10	15	10	3	0
57	4	3	20	70	30	25	75	30	1	1
58	3	3	95	100	45	15	95	25	1	3

El estudio experimental se realizó sobre las 58 muestras utilizando la técnica HR-MAS. Para todas ellas se adquirieron un conjunto de espectros 1D: i) PRESAT; ii) CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill sequence) y iii) NOESY (nuclear Overhauser effect spectroscopy).

La **Figura 13** muestra, a modo de ejemplo representativo, el espectro 1D PRESAT correspondiente a la muestra número 30 del estudio, que corresponde a un adenoma hipofisario no funcionante. El diagnóstico anatómico patológico fue de adenoma hipofisario. En el estudio inmunohistoquímico existía inmunorreactividad frente a GH para el 1% y frente a FSH para el 10% de las células tumorales, siendo negativa para el resto de las hormonas hipofisarias. Los índices de proliferación celular fueron del 1% para Ki 67 y negativo para p53. En este espectro 1D PRESAT se incluye toda la

información metabólica de la muestra de biopsia estudiada y, como puede apreciarse, tanto su resolución como la relación señal/ruido son excelentes. En este espectro se han etiquetado también a modo de ejemplo, la asignaciones correspondientes a diferentes grupos de distintos metabolitos, realizadas a partir de la combinación de espectros 2D,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC que posteriormente se describirán.

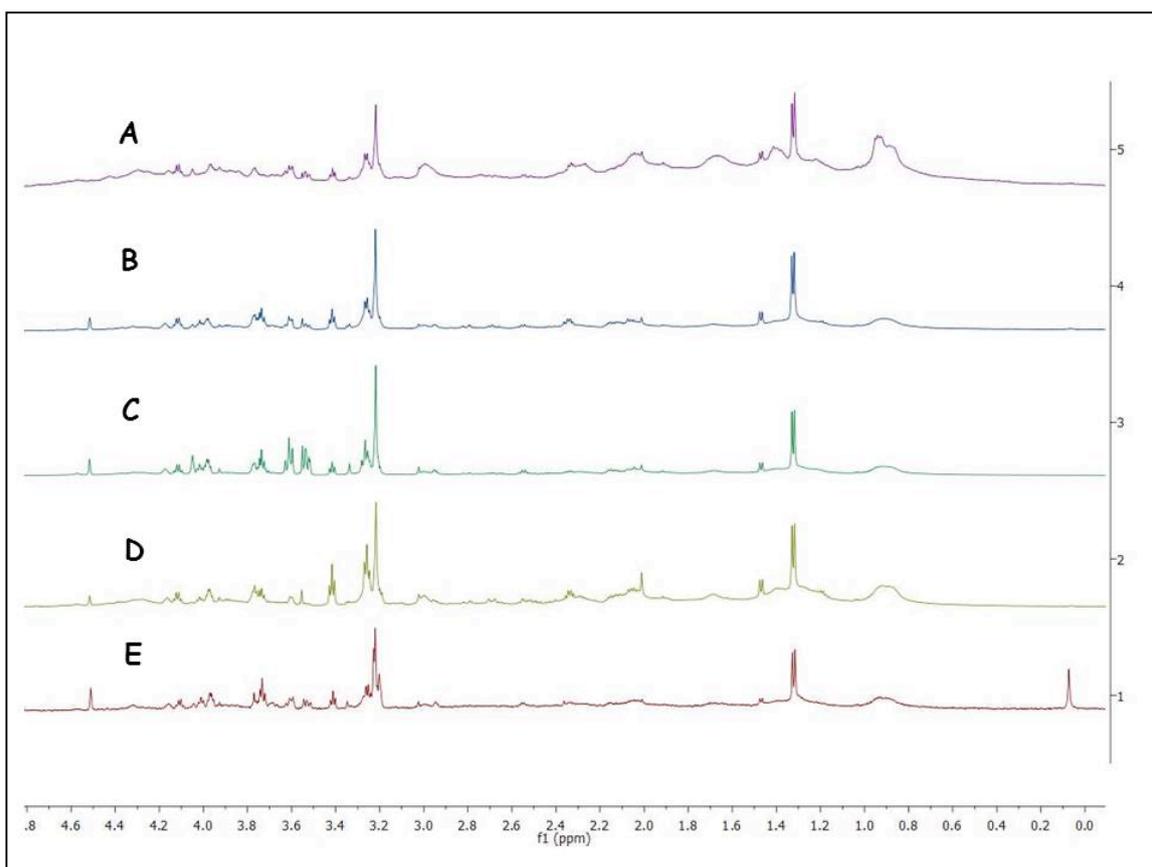


**Figura 13.-** Región alifática (0,0 – 4,5 ppm) del espectro 1D PRESAT para la muestra 30 (33.4 mg) del estudio. Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias. Diagnóstico clínico de adenoma no funcionante. Diagnóstico histopatológico de adenoma hipofisario. Se han etiquetado, a modo de ejemplo, diversas asignaciones de diferentes grupos de distintos metabolitos (identificados e incluidos en la **Tabla 3**).

Para todas las muestras estudiadas, independientemente del subtipo clínico de adenoma hipofisario al que corresponden, los espectros 1D PRESAT presentan características similares al previamente descrito (**Figura 13**), tanto para la resolución como para el cociente señal/ruido. La contribución de las señales espectrales anchas,

correspondientes a fragmentos de ácidos grasos, fue relevante en un conjunto limitado de 5 biopsias (muestras 15, 44, 47, 50 y 58).

Como ejemplo, la **Figura 14** incluye el espectro 1D PRESAT de cinco muestras tumorales. Cada una de ellas corresponde a uno de los cinco subtipos diferentes de adenoma hipofisario en función de su diagnóstico clínico: enfermedad de Cushing, acromegalia, adenoma no funcionante, tirotropinoma y prolactinoma.



**Figura 14.-** Región alifática (0,0 – 4,8 ppm) de espectros 1D PRESAT para cinco muestras de adenoma hipofisario con diagnóstico clínico diferente: (A) enfermedad de Cushing (4); (B) acromegalia (3); (C) adenoma no funcionante (2); (D) Tirotropinoma (5); (E) Prolactinoma (1). Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.

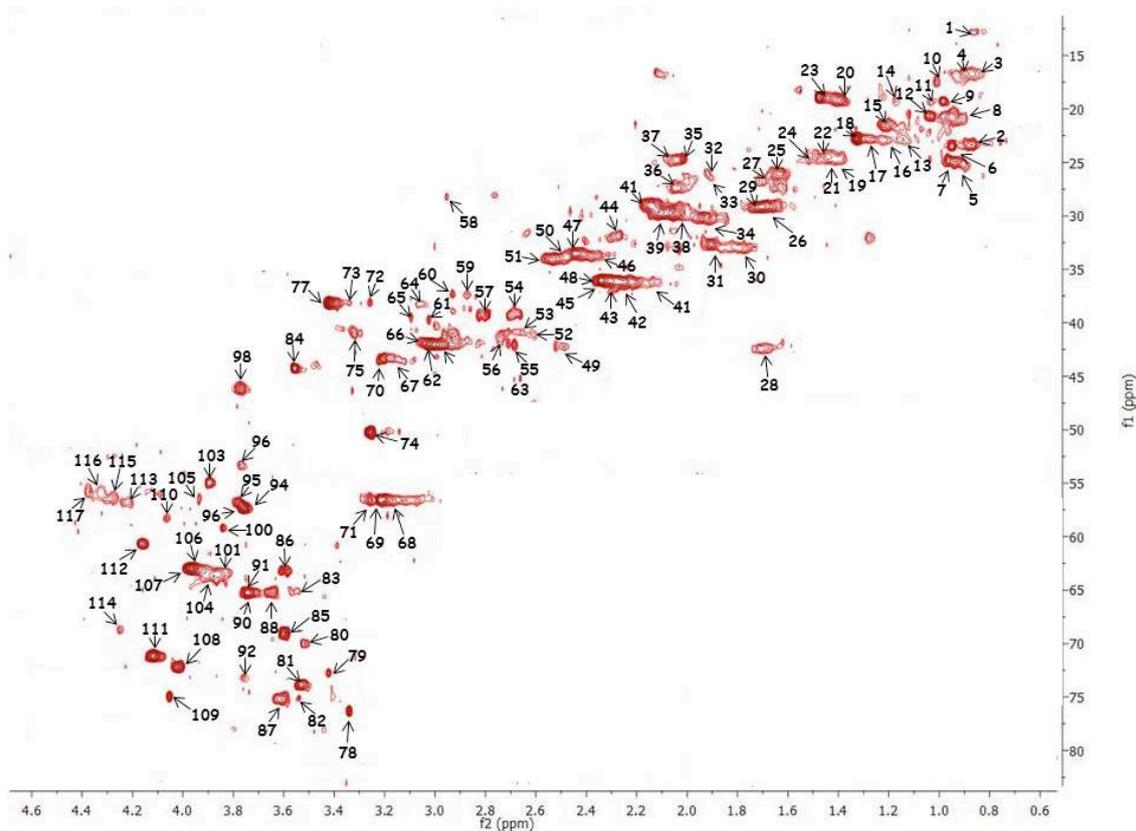
En la **Tabla 2** se incluyen a su vez los datos correspondientes a la inmunorreactividad frente a hormonas hipofisarias para cada una de estas muestras.

**Tabla 2.-** Datos inmunohistoquímicos para las 5 muestras estándar incluidas en la Figura 2. El subtipo de adenoma se basa en el diagnóstico clínico y corresponde respectivamente a: prolactinoma (1), adenoma no funcionante (2), acromegalia (3), enfermedad de Cushing (4) y tirotropinoma (5).

CASO	DIAGNOSTICO CLINICO	DIAGNOSTICO ANATOMO-PATOLOGICO	IHQ PRL	IHQ GH	IHQ ACTH	IHQ FSH	IHQ LH	IHQ TSH	Ki 67	p53
15	4	1	50	100	100	0	0	0	0	0
14	3	1	0	100	0	0	0	0	1	1
30	2	1	0	1	0	10	0	0	1	0
26	5	1	1	15	0	0	0	0	3	1
55	1	1	50	50	0	0	0	0	2	1

A primera vista se pueden apreciar algunas diferencias entre los espectros 1D PRESAT correspondientes a los perfiles metabólicos de las muestras de los 5 diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios presentados en la **Figura 14**. No obstante, para la extracción de las diferencias que permitan la distinción entre los diferentes grupos de adenomas hipofisarios, se ha utilizado la metodología estadística descrita en el apartado de material y métodos.

La identificación de los sistemas de espín y de las resonancias para los espectros ex-vivo se ha conseguido a través de espectros bidimensionales heteronucleares ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) (**Figura 15**) y homonucleares ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY) (**Figura 16**), usando datos bibliográficos<sup>35</sup>. Se han usado también asignaciones adicionales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mediante simulación para algunos componentes, particularmente para ácidos grasos<sup>35</sup>. La asignación de una parte importante de los metabolitos presentes en las muestras estudiadas, concretamente para algunos aminoácidos, se ha llevado a cabo mediante la combinación de los espectros 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (**Figura 15**) y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY (**Figura 16**). Como referencia de los desplazamientos químicos en los espectros HR-MAS de las muestras se utiliza la resonancia del doblete  $\text{CH}_3$  del lactato ( $\delta$   $^1\text{H}$  ppm/DSS 1,33;  $\delta$   $^{13}\text{C}$  ppm/DSS 22,7) y el cuádruplete CH ( $\delta$   $^1\text{H}$  ppm/DSS 4,11;  $\delta$   $^{13}\text{C}$  ppm/DSS 71,15). Mediante la utilización de esta técnica, se han podido identificar un total de 40 metabolitos. La asignación y confirmación de una parte importante de ellos se ha realizado mediante el uso de dos bases de datos metabólicas<sup>11, 12</sup>.



**Figura 15.-** Región alifática ( $w_1$   $^{13}\text{C}$  14,75 – 85,00 ppm) y  $w_2$   $^1\text{H}$  0,4 – 4,5 ppm) del espectro HSQC HR-MAS de la muestra 17, con diagnóstico clínico acromegalia (56,4 mg). Eje de abscisas: desplazamiento químico  $^1\text{H}$  en ppm. Eje de ordenadas: desplazamiento químico  $^{13}\text{C}$  en ppm.

Los 40 diferentes metabolitos identificados y las 118 señales de sus grupos mejor resueltos en el espectro  $^{13}\text{C}$  HSQC HR-MAS (**Figura 15**) se recogen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.-** Desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para los espectros HR-MAS de adenomas hipofisarios. La referencia de los desplazamientos químicos es relativa a los grupos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}$  del lactato a 1,33 y 4,11 ppm, respectivamente, a campo más bajo de la señal de DSS en espectros HR-MAS.

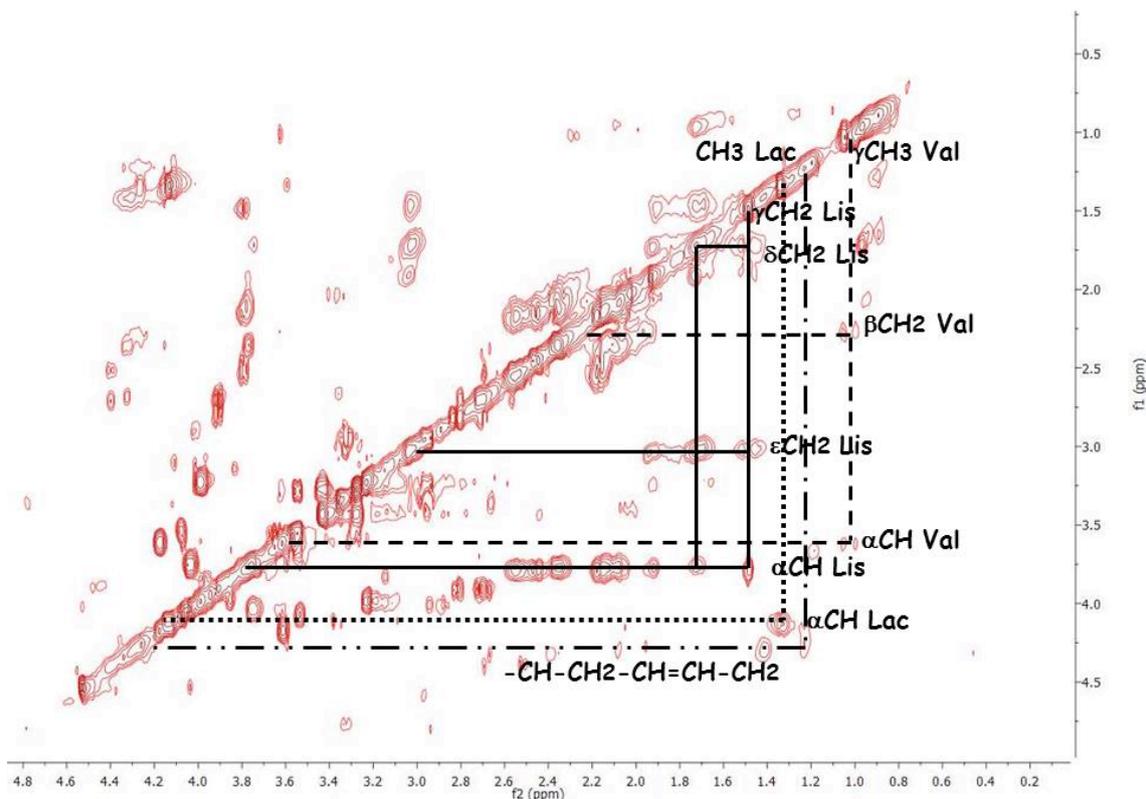
	<b>METABOLITO</b>	<b>GRUPO</b>	<b><math>^1\text{H}</math></b>	<b><math>^{13}\text{C}</math></b>
1	Isoleucina	$\delta\text{CH}_3$	0,87	12,77
2	Colesterol	11 $\text{CH}_3$	0,88	23,35
3	Ácido graso	$\text{CH}_3$	0,89	16,74

4	Ácido graso	CH3-CH2	0.90	16.65
5	Glicil-Leucina	C4H2	0,93	24,93
6	Leucina	δCH3	0,95	23,47
7	Leucina	δCH3	0,96	24,83
8	Ácido graso	CH3	0,94	20,88
9	Valina	γCH3	0,98	19,32
10	Isoleucina	δCH3	1,01	17,44
11	Colesterol	23CH3	1.03	19.39
12	Valina	γCH3	1,04	20,57
13	Colesterol	20CH2	1,14	22,89
14	Etanol	CH3	1,18	19,53
15	Treonina	γCH3	1,22	21,57
16	Ácido graso	CH3-CH2-CH2-	1,22	22,90
17	Ácido graso	CH3-CH2-	1,28	22,82
18	Lactato	CH3	1,32	22,70
19	Ácido graso	CH3-CH2-CH2	1,39	24,87
20	Ácido graso	CH3	1,39	19,16
21	Ácido graso	CH2	1,41	24,57
22	Lisina	γCH2	1,47	24,50
23	Alanina	βCH3	1,47	18,88
24	Colesterol	9CH2	1,57	24,50
25	Arginina	γCH2	1,67	26,61
26	Lisina	δCH2	1,69	29.11
27	Leucina	βCH2	1.70	26,84
28	Leucina	γCH	1,70	42,40
29	Arginina	βCH2	1,72	29,12
30	Colesterol	7CH2	1,84	32,92
31	Lisina	βCH2	1,90	32,61
32	GABA	3CH2	1,89	26,30
33	Acetato	CH3	1,91	25,94
34	Ornitina	3CH2	1,94	30,17
35	NAA	CH3	2,01	24,61
36	Ácido graso	CH=CH-CH2-	2,04	27,5
37	glucosamina	CH3	2,05	24,77
38	Glutamato	βCH2u	2,04	29,94
39	Glutamato	βCH2d	2,11	29,68
40	Glutación	7CH2	2.15	36.10
41	Glutamina	βCH2	2,16	28,87
42	Ácido graso	-CH2-CH2-CO-	2,24	36,25
43	GABA	4CH2	2,27	36,92
44	Valina	βCH	2,27	31,85
45	Glutamato	γCH2	2,34	36,11
46	Ácido graso	CH2-CH2-CO	2,38	33,86
47	Glutamina	γCH2	2.43	33.60
48	Succinato	2,3 CH2	2,40	36,61
49	NAA	βCH2u	2,48	42,17
50	Ácido succínico	4CH2	2.49	33-93

51	Glutati3n	7CH2	2,55	34,00
52	3cido asp3rtico	$\beta$ CH2u	2,61	41,17
53	NAA	$\beta$ CH2d	2,68	40,83
54	Aspartato	5CH2	2,69	39,34
55	3cido succ3nico	3CH2	2,70	42,17
56	Malato	CH2d	2,70	47,28
57	3cido Asp3rtico	$\beta$ CH2u	2,79	39,04
58	Glutati3n	14CH2	2,95	28,37
59	Aspargina	$\beta$ CH2u	2,87	37,33
60	Aspargina	$\beta$ CH2d	2,93	37,30
61	Creatina	CH3	3,02	39,69
62	GABA	2CH2	3,03	41,82
63	Ornitina	5CH2	2,99	41,96
64	Tirosina	bCH2u	3,07	38,31
65	Fenilalanina	bCH2u	3,10	39,46
66	Lisina	$\epsilon$ CH2	3,05	41,82
67	Etanolamina	-CH2-NH3+	3,12	44,00
68	Colina	-N+-(CH3)3	3,19	56,54
69	Fosfocolina	-N+-(CH3)3	3,21	56,71
70	Arginina	$\delta$ CH2	3,21	43,27
71	Glicerofosfocolina	-CH2-NH3+	3,23	56,78
72	Taurina	2CH2	3,26	38,17
73	Tirosina	$\beta$ CH2d	3,26	38,07
74	Taurina	-CH2-NH3+	3,26	50,19
75	Fenilalanina	$\beta$ CH2d	3,33	40,68
76	Mioinositol	C5H	3,25	77,04
77	Taurina	-CH2-SO3-	3,41	38,07
78	Scilo-Inositol	CH2	3,34	76,28
79	$\alpha$ Glucosa	C4H	3,43	72,76
80	Colina	$\beta$ CH2	3,52	70,01
81	Mioniositol	C1H, C3H	3,53	73,74
82	$\alpha$ Glucosa	C2H	3,53	75,06
83	Glicerol	1,3CH2OHu	3,54	65,06
84	Glicina	$\alpha$ CH	3,55	44,10
85	Fosfocolina	$\beta$ CH2	3,60	69,11
86	Valina	$\alpha$ CH	3,60	63,09
87	Mioinositol	C4H, C6H	3,61	75,22
88	Glicerol	1,3 CH2OHd	3,65	65,16
89	Etanol	C2H2	3,65	60,15
90	Glicerofosfocolina	$\beta$ CH2	3,70	65,20
91	$\alpha$ Glucosa	C6Hu	3,74	65,22
92	$\alpha$ Glucosa	C5H	3,76	73,16
93	Leucina	$\alpha$ CH	3,73	56,10
94	Glutamato	$\alpha$ CH	3,76	57,25
95	Glutamina	$\alpha$ CH	3,76	56,97
96	Lisina	$\alpha$ CH	3,77	56,91
97	Alanina	$\alpha$ CH	3,77	53,22

98	Glutation	17CH	3,78	45,97
99	Etalonamina	-CH <sub>2</sub> -OH	3,83	70,90
100	Serina	αCH	3,84	59,11
101	β-Glucosa	C6Hd	3,88	63,60
102	Arginina	αCH	3,87	56,54
103	Aspartato	6CH	3,89	54,94
104	βGlucosa	C6Hd	3,91	63,63
105	Creatina	CH <sub>2</sub>	3,93	56,44
106	Serina	βCH <sub>u</sub>	3,94	62,16
107	Serina	βCH <sub>d</sub>	3,94	62,16
108	Glicerofosfocolina	-C <sub>2</sub> H-OH	4,01	72,14
109	Mioinositol	C <sub>2</sub> H	4,05	74,93
110	Colina	αCH <sub>2</sub>	4,06	58,25
111	Lactato	CH	4,12	71,13
112	Fosfocolina	αCH <sub>2</sub>	4,17	60,70
113	Glicil-L-Leucina	C <sub>1</sub> H	4,21	56,83
114	Treonina	βCH <sub>2</sub>	4,25	68,75
115	Glicerofosfocolina	αCH <sub>2</sub>	4,28	56,70
116	NAA	αCH	4,38	56,05
117	Glutación	11CH	4.58	58.55
118	Fenilalanina	CH 2,6	7.30	132,0

La **Figura 16** representa, a modo de ejemplo, la asignación de un conjunto de sistemas de espín de diversos metabolitos en el espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY HR-MAS.



**Figura 16.-** Región alifática (0,0 – 4,7 ppm) del espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY HRMAS ( $4^\circ\text{C}$ ) a 600 MHz, para la biopsia 17, con diagnóstico clínico acromegalia (56,4 mg). Eje de abscisas: desplazamiento químico  $^1\text{H}$  en ppm. Eje de ordenadas: desplazamiento químico  $^1\text{H}$  en ppm. Los picos cruzados asignados están de acuerdo con los datos de la **Tabla 3**.

La señal del doblete del grupo  $\text{CH}_3$  ( $\delta$   $^1\text{H}$  1,32 ppm) del lactato es la que presenta mayor intensidad en la mayoría de los espectros 1D para las 58 biopsias estudiadas de tumores hipofisarios. En algunas muestras, como la (A) de la **Figura 14**, aparece un hombro a campo bajo, potencialmente asignable a fragmentos de lípidos. Siguiendo en intensidad en los espectros, se encuentran las resonancias alrededor de 3,20 ppm de los derivados de la colina, en particular la Fosfocolina, como claramente se puede observar en los espectros 1D de las **Figuras 13 y 14**. Asimismo, con un nivel de intensidad destacable se observa a 1,47 ppm la resonancia del grupo  $\text{CH}_3$  de la Alanina (Ala) que puede estar en parte distorsionado por un pico ancho a campos altos. Las señales solapadas de la Creatina (Cr) y Fosfocreatina (PCr) se detectan alrededor de 3,03 ppm. La señal del grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) del NAA (número 35 de la **Tabla 3**) se encuentra parcialmente solapada con las señales  $\beta\text{CH}_2$  de Glucosamina, Glutamina y

Glutamato, así como de la resonancia  $\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}$  de ácidos grasos. No obstante, sí que se han podido claramente identificar en el espectro  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC (**Figura 15**) las resonancias del grupo  $\text{CH}_3$  (35 en **Tabla 3**) y  $\text{CH}_2$  (49 y 53 en **Tabla 3**), aunque al no estar escalarmente acoplados, dichos grupos no se pueden observar en el espectro  $^1\text{H}-^1\text{H}$  TOCSY (**Figura 16**).

Sin embargo, las señales a 2,01, 2,48 y 2,68 ppm (35, 49 y 53, respectivamente, en **Tabla 3** y **Figura 18**) se han podido identificar y asignar en los espectros HR-MAS  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC, en particular la resonancia a 2,48 ppm (49 en **Tabla 3** y **Figura 15**), correspondiente al grupo  $\beta\text{CH}_2$  (a campo alto).

Los grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) y metilo ( $\text{CH}_3$ ) proporcionan un pico degenerado a 3,93 y 3,02 ppm (61 y 105 en **Tabla 3** y **Figura 15**) respectivamente, parcialmente solapados con los picos cruzados  $\alpha\text{CH}/\beta\text{CH}_2$  de Tirosina y Fenilalanina. Las resonancias de cruce a 3,93-56,44 ppm (105 en **Tabla 3** y **Figura 15**) y 3,02-36,69 ppm (61 en **Tabla 3** y **Figura 15**) se asignaron a los grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  de Creatina y Fosfocreatina, respectivamente, que no han podido ser resueltos en diversos estudios<sup>35</sup>.

Los derivados de la Colina muestran un solo pico de cruce en los espectros  $^1\text{H}-^1\text{H}$  TOCSY entre  $\alpha\text{CH}_2$  y  $\beta\text{CH}_2$  (4,06-3,52 ppm para Colina, 4,17-3,50 ppm para Fosfocolina y 4,28-3,70 ppm para Glicerofosfocolina). En los espectros  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC se observan los picos de cruce individuales para  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  (3,19-56,54, 3,21-56,72 y 3,23-56,78 ppm, 67, 68 y 71 en **Tabla 3** y **Figura 15**) para Colina, Fosfocolina y Glicerofosfocolina, respectivamente. De manera similar: i)  $\alpha\text{CH}_2$  (4,06-58,25, 4,17-60,70 y 4,28-56,70 ppm, 110, 112 y 115 en **Tabla 3** y **Figura 15**), y ii)  $\beta\text{CH}_2$  (3,53-70,01, 3,60-69,11 y 3,70-65,20 ppm, 80, 85 y 90 en **Tabla 3** y **Figura 15**). La mayor anchura de los picos de los grupos  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  en los espectros  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC puede ser explicada por la elevada dinámica rotacional del grupo trimetilo ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>.

Los espectros  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC también han sido extremadamente útiles en la identificación única de: i) picos solapados, como por ejemplo  $\alpha$ -Glucosa; ii) Glicerol, que no puede ser adecuadamente asignado en los espectros TOCSY por problemas de solapamientos; iii) Glutación a través de los picos de cruce en  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HSQC como  $7\text{CH}_2$

(2,15-36,10 ppm 40 en **Tabla 3** y **Figura 15**); 8CH<sub>2</sub> (2,35-34,00 ppm, 51 en **Tabla 3** y **Figura 15**), 14CH<sub>2</sub> (2,95,28,37 ppm, 58 en **Tabla 3** y **Figura 15**); 17CH (3,78-45,97 ppm, 98 en **Tabla 3** y **Figura 15**) y 11CH (4,58-58,55 ppm, 117 en **Tabla 3** y **Figura 15**); iv) Colesterol, mediante los picos de cruce en espectros <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC como 11 y 23CH<sub>3</sub> (0,86-23,15 y 1,03-19,39 ppm, 8 y 41 en **Tabla 3** y **Figura 15**, respectivamente); 20CH<sub>2</sub> (1,14-22,89 ppm, 13 en **Tabla 3** y **Figura 15**); 9CH<sub>2</sub> (1,57-24,50 ppm, 24 en **Tabla 3** y **Figura 15**); 7CH<sub>2</sub> (1,84-32,92 ppm, 30 en **Tabla 3** y **Figura 15**); y v) ornitina, a través de las resonancias de cruce en <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, 3CH<sub>2</sub> (1,94-30,17 ppm, 34 en **Tabla 3** y **Figura 15**) y 5CH<sub>2</sub> (2,99-41,96 ppm, 63 en **Tabla 3** y **Figura 15**).

Los grupos alifáticos de los aminoácidos, identificados 16 de los 20 básicos, están mayoritariamente solapados en los espectros 1D en una resonancia ancha entre 0,90 y 1,00 ppm, así como parcialmente, en otras regiones de los espectros 1D, como se observa en las **Figuras 13 y 14**. La resolución de los espectros <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY es suficiente para en gran medida superar los problemas de solapamiento mencionados. El análisis combinado de los espectros <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY y <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, como ejemplo, ha permitido la identificación de las resonancias γCH<sub>2</sub> de Lisina e Isoleucina (ambos a 1,47 ppm en <sup>1</sup>H) como responsables del hombro observado a altos campos respecto al doblete de la Alanina. Como ejemplo de identificación de un sistema de espín de aminoácido se muestran los diagramas de conectividades de las cadenas laterales para la Lisina y Valina en el espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY de la **Figura 16**.

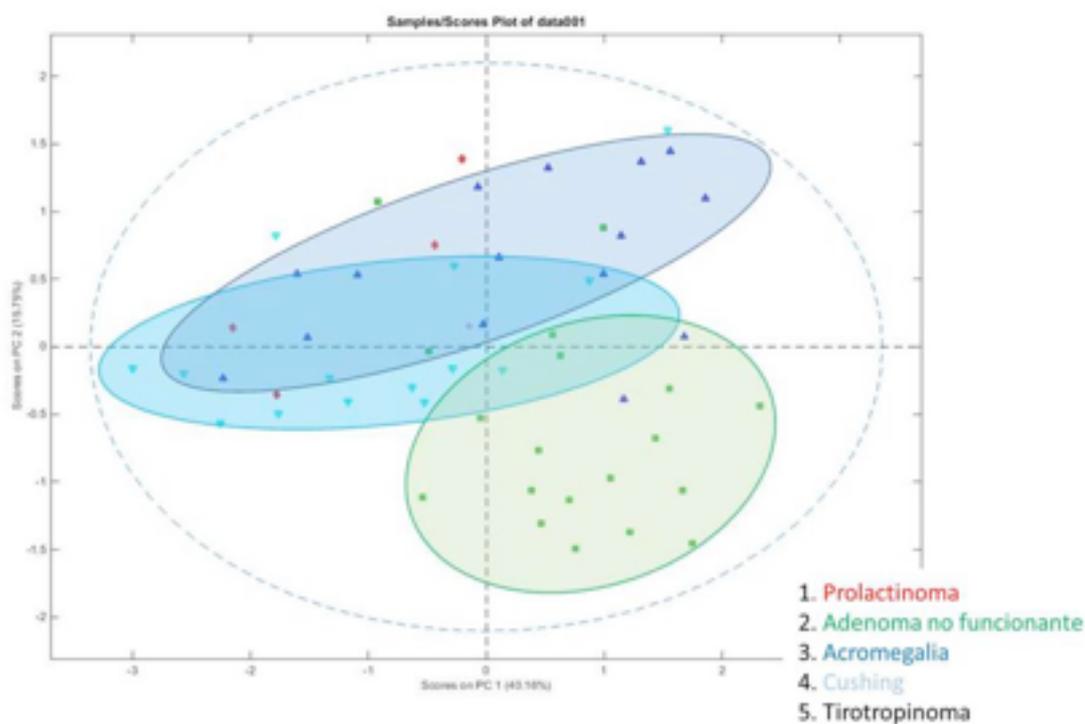
Un metabolito singular es el etanol que se observa única y nítidamente en los espectros <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC de dos de las muestras de biopsia (números 20 y 39), con diagnóstico enfermedad de Cushing, a través de los picos de cruce 1,18-19,53 y 3,65-60,15 ppm (14 y 89 en **Tabla 3** y **Figura 15**) correspondientes a los grupos CH<sub>3</sub> y 2CH<sub>2</sub>, respectivamente.

Los lípidos/ácidos grasos están presentes como señales anchas y distorsión de la línea base en los espectros de <sup>1</sup>H 1D con presaturación de la señal del agua. Los lípidos/ácidos grasos se pueden observar de manera clara en los espectros <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC analizados. Los desplazamientos químicos de los lípidos/ácidos grasos se han asignado

usando los datos de simulación de fragmentos de ácidos grasos incluidos en los datos bibliográficos del trabajo publicado en 2004 por Martínez-Bisbal, et al.<sup>35</sup>

Una vez identificados el máximo número de metabolitos se procedió al análisis estadístico de los espectros 1D para las 58 muestras de biopsias de adenomas hipofisarios estudiadas.

En la **Figura 17** se muestra el resultado correspondiente a la aplicación de PCA sin supervisar, al conjunto de los 58 espectros 1D PRESAT del total de las muestras de biopsias de adenomas hipofisarios analizadas. Aunque no se puede observar una nítida separación en el PCA sin supervisar entre los tres subtipos clínicos de adenomas hipofisarios para los que se contaba con un mayor número de muestras (adenomas no funcionantes, acromegalia y enfermedad de Cushing), sí que fue aparente una agrupación bastante significativa del grupo de adenomas hipofisarios no funcionantes con respecto a los de los diagnosticados de acromegalia y enfermedad de Cushing. Del total de 21 muestras de biopsias de adenomas hipofisarios correspondientes al diagnóstico clínico de adenoma no funcionante, 16 (76%) quedaron agrupadas y separadas en el análisis PCA sin supervisar, de los otros dos grandes subgrupos (acromegalia y enfermedad de Cushing). Para estos dos grupos, en el PCA sin supervisar (**Figura 17**) 8 de las 17 muestras de acromegalia (47%) y 9 de las 15 de enfermedad de Cushing (60%) pueden considerarse en gran medida agrupadas respecto a los otros dos grupos (no funcionantes+enfermedad de Cushing y no funcionantes+acromegalia, respectivamente). Con relación a los otros dos subtipos clínicos de adenomas hipofisarios estudiados, con diagnósticos de prolactinoma (4 muestras) y tirotropinoma (1 muestra) el análisis estadístico no resultó relevante debido al escaso número de muestras analizadas.

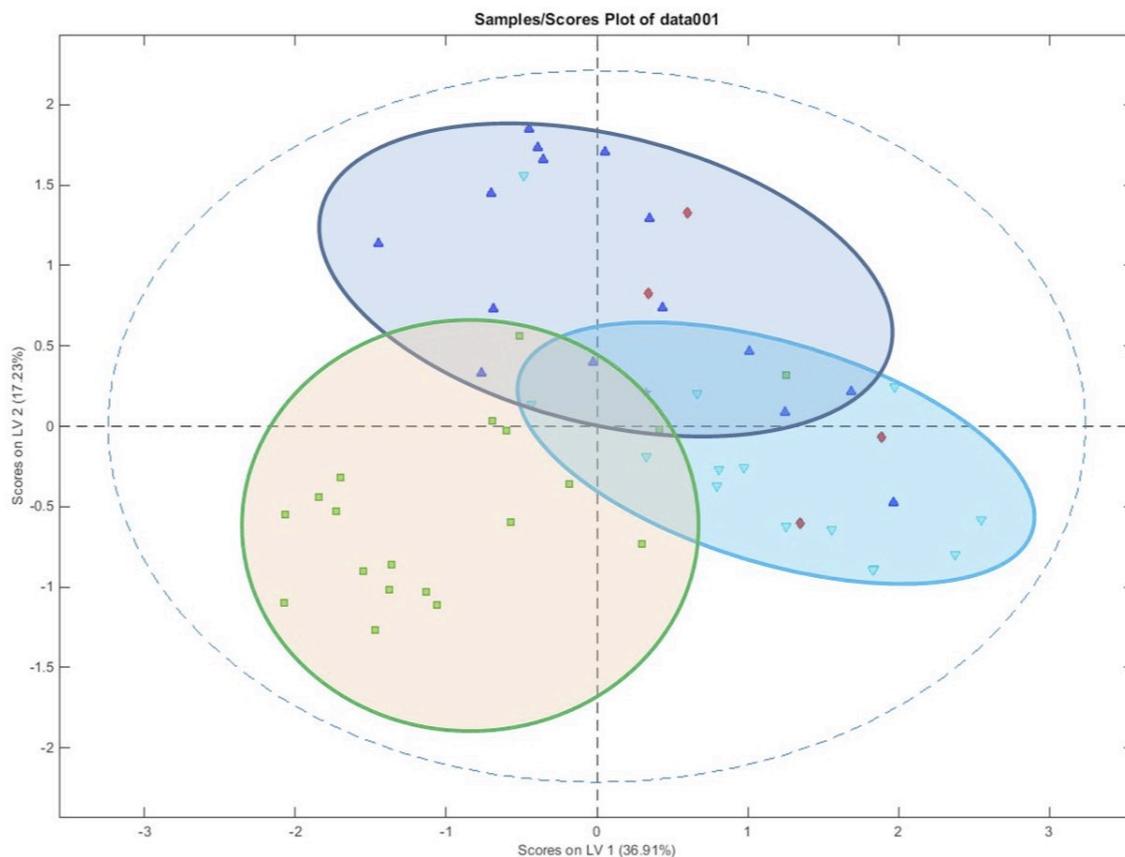


**Figura 17.-** Análisis PCA sin supervisar, de la distribución de las 58 muestras de tejido correspondientes a los cinco diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios, estudiados mediante perfiles metabólicos ex-vivo, obtenidos mediante la técnica RMN HR-MAS.

Habiendo constatado la parcial separación obtenida en el análisis de PCA sin supervisar, entre los tres subtipos clínicos de adenomas hipofisarios para los que se contaba con un mayor número de muestras, se extendió el análisis estadístico a PLS-DA. El modelo PLS-DA es un extensión supervisada de PCA, usada para distinguir dos o más clases mediante la búsqueda de las variables (matriz X) que están correlacionadas con un miembro de una clase (matriz Y).

En la **Figura 18** se incluye el resultado del análisis PLS-DA aplicado a las 58 muestras tisulares de adenomas hipofisarios estudiadas. En ella se puede comprobar, a partir de dos componentes principales representados por los ejes X e Y, como se obtiene una buena separación entre los tres subtipos clínicos de adenomas hipofisarios para los que se analizaron un mayor número de muestras: adenomas hipofisarios no funcionantes, acromegalia y enfermedad de Cushing. En este análisis, 19 de las 21

(90,5%) muestras de adenomas hipofisarios no funcionantes quedan agrupadas por diferencias metabólicas respecto a las muestras correspondientes a los adenomas con diagnóstico clínico de acromegalia y enfermedad de Cushing. Por otro lado, 15 de las 17 (88,2%) de adenomas hipofisarios con diagnóstico clínico de acromegalia, se agrupan por sus perfiles metabólicos con respecto a los adenomas diagnosticados como no funcionantes y enfermedad de Cushing. Finalmente, de las 15 muestras correspondientes a adenomas hipofisarios con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing, 114 (93,3%) se agruparon preferentemente por sus perfiles metabólicos con respecto a los adenomas diagnosticados como acromegalia y los no funcionantes.



**Figura 18.-** Análisis supervisado PLS-DA, de la distribución de las 58 muestras tisulares correspondientes a diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios, estudiados mediante perfiles metabólicos ex-vivo, obtenidos mediante la técnica RMN HR-MAS.

Dos de las muestras (54 y 56) de adenomas hipofisarios con diagnóstico clínico de prolactinomas, quedaron ubicadas en la región en la que, por su perfil metabólico, se agruparon las muestras de adenomas hipofisarios con diagnóstico clínico de acromegalia. Las dos restantes (50 y 55) lo hicieron en la región en la que se agruparon las muestras correspondientes al subtipo clínico enfermedad de Cushing. El reducido número de muestras de prolactinomas con las que se contaba para el estudio, no permitió obtener datos estadísticamente significativos.

La única muestra estudiada de una adenoma hipofisario con diagnóstico clínico de tirotrópina quedó centrada en el PLS-DA (**Figura 18**) de manera prácticamente equidistante respecto a los tres grupos mayoritarios (adenoma hipofisario no funcionante, acromegalia y enfermedad de Cushing). El contar con una sola muestra de tirotrópina tampoco permitió obtener datos estadísticamente significativos.

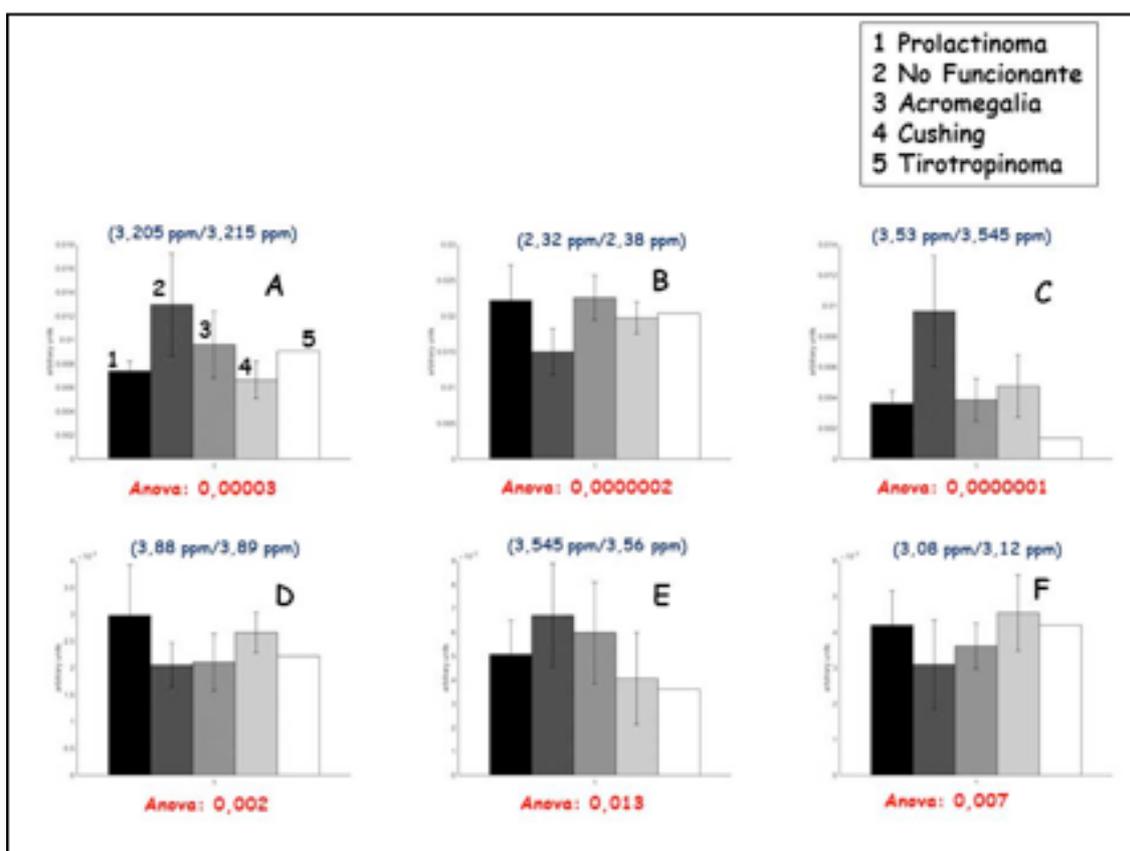
Para las 53 muestras restantes (excluidas las correspondientes a los cuatro casos de prolactinoma y al único tirotrópina a los que se ha hecho referencia), sólo 5 muestras (9,4%) no quedaron agrupadas por su perfil metabólico, en la región correspondiente al tipo de adenoma hipofisario al que pertenecían por su diagnóstico clínico. Se trataba de tres casos correspondientes a adenomas no funcionantes, un caso de acromegalia y un caso de enfermedad de Cushing.

Por último, existen 3 muestras de adenomas hipofisarios funcionantes, dos casos de enfermedad de Cushing (muestras 51 y 57) y uno de acromegalia (muestra 58) respectivamente, para las cuales el diagnóstico histopatológico fue de tejido hipofisario normal. Desde el punto de vista de su perfil metabólico, las tres quedaron perfectamente agrupadas en la región correspondiente a su respectivo diagnóstico clínico de subtipo de adenoma hipofisario. La muestra de adenoma hipofisario no funcionante (muestra 49) para la que el diagnóstico histopatológico fue de tejido necrótico, quedó ubicada por su

perfil metabólico, en la región PLS-DA en la que se agruparon la mayor parte de las correspondientes a su diagnóstico clínico (**Figura 18**).

Para poder identificar los posibles metabolitos o grupos de metabolitos responsables de la diferenciación entre los tres subtipos clínicos de adenomas hipofisarios para los que se contaba con un suficiente número de muestras (adenomas no funcionantes, acromegalia y enfermedad de Cushing), se realizó un análisis estadístico ANOVA buscando aquellas regiones de los espectros 1D PRESAT con los valores p más pequeños y por consiguiente, con mayor implicación en las diferencias metabólicas.

En la **Figura 19** se incluyen las 6 regiones de los espectros 1D PRESAT con valores estadísticamente significativos, calculados mediante ANOVA.



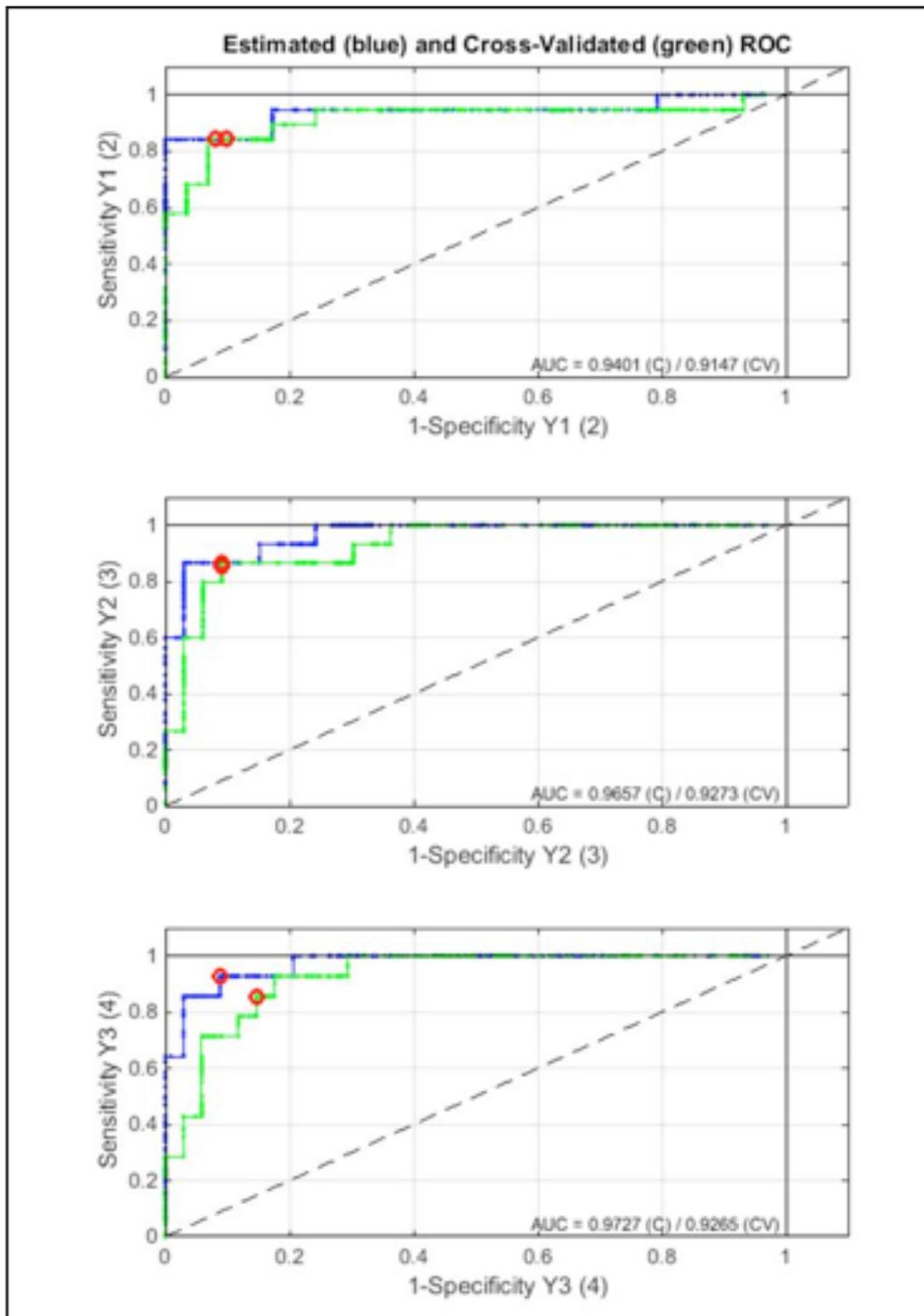
**Figura 19.-** Gráficas de valores ANOVA, con barras de errores, para los 5 subtipos clínicos de adenomas hipofisarios estudiados, en 6 regiones diferentes de los 58

espectros 1D presat: (A) 3,205/3,215 ppm; (B) 2,32/2,38 ppm; (C) 3,53/3,545 PPM; (D) 3,88/3,89 ppm; (E) 3,545/3,56 ppm; y (F) 3,08/3,12 ppm)

- a) La región (A) 3,205/3,215 ppm presenta significación estadística, 0,00003. En ella se incluyen metabolitos como Colina, Fosfocolina, Arginina y Glicefosfocolina (resonancias 68, 69, 70 y 71 de la **Tabla 3**).
- b) En la (B) 2,32/2,38 ppm, el valor de  $p = 2,3 \cdot 10^{-7}$ . Incluye los siguientes metabolitos: GABA, Valina y Glutamato (resonancias 43, 44 y 45 de la **Tabla 3**).
- c) En la región (C) 3,53/3,545 ppm, el valor de  $p = 1,3 \cdot 10^{-7}$ . Incluye los siguientes metabolitos: mio-Inositol,  $\alpha$ -glucosa y Glicerol (resonancias 82, 83 y 84 de la **Tabla 3**).
- d) La región (D) 3,88/3,89 ppm presenta un valor de  $p = 0,002$ . Incluye  $\beta$ -glucosa, Arginina y Aspartato (resonancias 101, 102 y 103 de la **Tabla 3**).
- e) En la región (E) 3,545/3,56 ppm,  $p = 0,01$ . Incluye a los siguientes metabolitos: Glicerol y Glicina (resonancias 83 y 84 de la **Tabla 3**).
- f) En la región (F) 3,08/3,12 ppm, el valor de  $p = 0,007$ . En ella se incluyen: Tirosina, Fenilalanina y Etanolamina (señales 64, 65 y 67 de la **Tabla 3**).

En la **Figura 20** se incluyen las curvas ROC para las tres variables con mayor poder de discriminación entre los tres subtipos clínicos de adenomas hipofisarios para los que se contaba con un suficiente número de muestras (adenomas no funcionantes, acromegalia y enfermedad de Cushing).

Estas tres variables corresponden con las regiones con mayor significación estadística (valores de  $p$  más bajos): (A), (B) y (C) de la **Figura 19**. En las tres curvas ROC de la **Figura 20** se incluyen tanto los valores cruzados sensibilidad vs especificidad estimados (en azul) como los correspondientes a las validaciones cruzadas (en verde).



**Figura 20.-** Curvas ROC correspondientes a los tres factores más discriminantes Y (1), Y (2) e Y (3), para la discriminación por perfiles metabólicos entre los cinco diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios presentes entre las 58 muestras tumorales estudiadas mediante la técnica RMN-HRMAS.

Como conclusión inmediata se puede considerar que las tres curvas ROC para los tres variables más discriminatorias son muy buenas, con valores  $> 0,90$ . Concretamente para:

- i) Y1, parte superior de la Figura 3, el valor de la curva ROC es 0,94 y 0.91, para valores estimados y de validación cruzada, respectivamente.
- ii) Y2, parte intermedia Figura 3, el valor de la curva ROC es 0,965 y 0.93, para valores estimados y de validación cruzada, respectivamente.
- iii) Y3, parte inferior de la Figura 3, el valor de la curva ROC es 0,97 y 0.93, para valores estimados y de validación cruzada, respectivamente.

## 5. DISCUSIÓN



El número de muestras analizadas durante la realización del presente estudio, ha venido determinado por dos factores: la disponibilidad de muestras de tejido tumoral y el coste económico de realización de cada uno de los análisis.

La no existencia en nuestro medio, de un sistema de referencia para patologías raras o poco frecuentes, que permita concentrar su manejo y tratamiento en determinados centros o unidades especializadas hace que, como ocurre para los diferentes tipos de adenomas hipofisarios, la casuística se disperse. Por esta razón, el número de tumores hipofisarios tratados por cada unidad o cirujano anualmente no suele ser elevado y no facilita la adquisición de experiencia ni el desarrollo de actividades de investigación que requieran disponer de un número suficiente de muestras biológicas.<sup>86</sup> Además, los adenomas hipofisarios son, con frecuencia, lesiones de pequeño tamaño y de consistencia no sólida, por lo que la cantidad de tejido obtenida durante las intervenciones es pequeña y, muchas veces, debe ser utilizada de manera exclusiva para realizar los estudios anatomo-patológicos e inmunohistoquímicos necesarios para su diagnóstico. Por otro lado, para la realización de un estudio como el que es objeto de la presente tesis, es necesaria la obtención y conservación de muestras tumorales, de forma sistemática, a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Estas son algunas de las principales razones por las que, probablemente y hasta el momento, no se han realizado en adenomas hipofisarios, estudios descriptivos sobre su perfil metabólico medidos por técnicas de espectroscopia de RM *ex-vivo*, cuando por el contrario, sí se han realizado para otros tipos de lesiones y tumores del SNC.<sup>35, 40, 41, 43, 47, 48, 50-55</sup> En nuestro caso, en el curso de los últimos 15 años, hemos tenido la ocasión de intervenir un elevado número de pacientes afectados de lesiones de la región selar y, desde el año 2006, se inició la recogida y conservación en condiciones de ultracongelación, de muestras tisulares de todas aquellas lesiones de las que se consiguió un excedente después de obtener la cantidad de tejido necesaria para realizar las técnicas de diagnóstico anatomo-patológico.

En el diseño del trabajo experimental, se decidió analizar un número homogéneo y lo más amplio posible de muestras, para los tres subtipos que, desde un punto de vista clínico, son más frecuentes con respecto al diagnóstico endocrinológico entre los adenomas hipofisarios (adenomas no funcionantes, acromegalia y enfermedad de Cushing). Tras revisar la bibliografía relativa a la descripción del perfil metabólico de

otros tumores del SNC, mediante espectroscopia ex-vivo por RM de alta resolución con rotación al ángulo mágico, se planteó que una población de estudio que incluyese al menos 15 muestras para cada uno de estos tres subtipos tumorales, resultaría adecuada a los objetivos del trabajo.<sup>35, 38, 43, 46, 48, 50-55</sup> El número de muestras finalmente analizadas para cada uno de ellos fue de 21 para adenomas hipofisarios no funcionantes, 17 para acromegalia y 15 para enfermedad de Cushing. Para los prolactinomas, se analizaron 4 tumores, lo que supuso la totalidad de muestras disponibles que resultaron adecuadas en función de cantidad y calidad de conservación del tejido. El hecho de que el prolactinoma sea el único tipo de adenoma hipofisario para el que el tratamiento de elección es médico y no quirúrgico hace que, a pesar de ser el subtipo más frecuente, esté escasamente representado en las series quirúrgicas recientes y que el número de muestras disponibles sea menor, como ocurre en nuestro caso.<sup>81-84, 157</sup> Los tirotropinomas son el subtipo menos frecuente de adenoma hipofisario y representan, aproximadamente, el 1-2% del total de los mismos, siendo el caso analizado el único, de los dos de nuestra serie quirúrgica, para el que pudo conservarse una muestra tisular útil.<sup>95</sup>

La no disponibilidad de información relativa al perfil metabólico del tejido hipofisario estrictamente normal, medida mediante la técnica de HR-MAS, es una de las carencias de este estudio. Para poder definir algunos de los hallazgos del perfil metabólico de los diferentes tipos de adenomas hipofisarios como características diferenciales específicas y validables como biomarcadores de un estado de enfermedad, sería conveniente conocer el perfil metabólico del tejido hipofisario no patológico y compararlo con el de los cada subtipo tumoral. Sin embargo, el obstáculo que supone la dificultad de obtener tejido hipofisario humano sano para su análisis, es de carácter prácticamente insalvable. Hace años, la práctica de hipofisectomías en las que se resecaba completamente la glándula hipófisis normal era relativamente frecuente, ya que dicha técnica se consideraba indicada como parte del tratamiento de pacientes afectas de cáncer de mama avanzado, en las que el tumor era de tipo hormono-dependiente.<sup>166</sup> Posteriormente, el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos de probada eficacia en el bloqueo hormonal y en el control del volumen tumoral, convirtió a la extirpación quirúrgica de la hipófisis, en un procedimiento obsoleto en ese contexto.<sup>81-84</sup> En la actualidad, la posibilidad de obtener quirúrgicamente tejido hipofisario humano normal es inviable en la medida que, éticamente, no puede

justificarse el riesgo de morbilidad y mortalidad al que se expondría a una persona sana que fuese sometida a una cirugía intracraneal con fines no terapéuticos. Por el mismo motivo, tampoco sería aceptable la extirpación electiva de una parte del tejido hipofisario sano, en el transcurso de cirugías realizadas con el fin de tratar una lesión adyacente (por ejemplo un tumor selar no originado en la glándula hipófisis), dado que ello supondría un incremento no justificable en la probabilidad de complicaciones y morbilidad del procedimiento. Como alternativa, se planteó la posibilidad de analizar tejido hipofisario humano obtenido de cadáveres durante la práctica de autopsias. Sin embargo, la situación metabólica de un tejido cambia por completo desde el momento inmediatamente posterior a la muerte y, por otra parte, el intervalo de tiempo que transcurre entre el momento del fallecimiento de una persona y el de realización de la necropsia es prolongado. Este hecho determina que la información metabólica potencialmente obtenida a partir del estudio de este tejido, no pueda considerarse representativa o extrapolable a la del tejido vivo normal y, por tanto, hizo que se desechase esta posibilidad. En cualquier caso y de forma característica, los adenomas hipofisarios son un grupo heterogéneo de lesiones en términos de producción hormonal y, previsiblemente, de perfil metabólico. Así, los adenomas no funcionantes con relación a los que sí secretan una determinada hormona y, entre estos últimos, los que producen cada una de ellas, originan diferentes estados de enfermedad. Cada tipo de adenoma hipofisario se caracteriza por tener unas circunstancias clínicas y diagnósticas distintas, así como por implicaciones que también son diversas, desde el punto de vista pronóstico y terapéutico. Por esta razón consideramos que, aun sin poder establecer una comparación objetiva entre los perfiles metabólicos de adenomas hipofisarios e hipófisis normal, el análisis comparativo entre los diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios, sigue teniendo un elevado interés, tanto desde el punto de vista de la investigación científica, como desde el de su potencial traslación a la clínica en el futuro.



## 5.1. DESCRIPCIÓN DEL PERFIL METABÓLICO

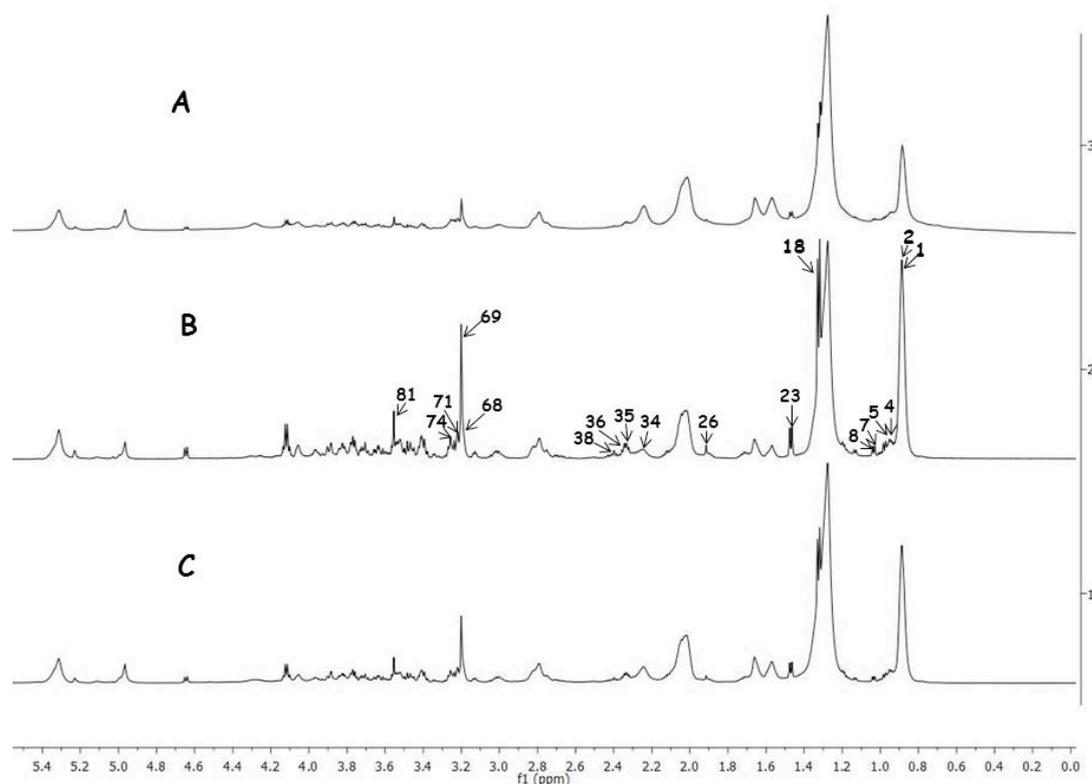
Los espectros 1D PRESAT (**Figuras 13 y 14**), en los que se encuentra incluida toda la información metabólica de la muestra de biopsia analizada, son muy útiles para la descripción global del perfil bioquímico de los diferentes subtipos de adenomas hipofisarios, incluyendo la contribución de los lípidos como señales anchas que pueden producir distorsiones en la línea base. Concretamente, muchos de los metabolitos más comunes detectados, pueden ser directamente asignados en los espectros 1D PRESAT (**Figura 13**).

En la **Figura 21** se incluye, a modo de ejemplo, la comparación entre espectros 1D PRESAT y 1D CPMG para una muestra de biopsia (número 50) con diagnóstico clínico de prolactinoma. El espectro en la parte superior (A) corresponde a la secuencia más sencilla, la de pulso 1D PRESAT, que se obtiene con un pulso de excitación de 90° seguido del tiempo de adquisición y relajación en donde se satura la señal del H<sub>2</sub>O. La ventaja más importante de esta secuencia de pulso es que, en el espectro correspondiente, se recoge la información de todos los metabolitos que se encuentren presentes en la muestra con concentraciones  $\geq 0,5$  mmol. No obstante, también se observan en dicho espectro, las señales correspondientes a metabolitos con elevado peso molecular (con T<sub>2</sub> cortos) que dan lugar a señales anchas que se solapan a las resonancias más estrechas correspondientes a los metabolitos de bajo peso molecular (T<sub>2</sub> largo) y que pueden además distorsionar la línea base del espectro.

Como se puede observar en el mencionado espectro (A) de la **Figura 21**, las resonancias con mayor intensidad son las más anchas. Se pueden destacar en él 6 resonancias, que se sitúan respectivamente alrededor de 0,9, 1,4, 1,6, 1,7, 2,02 y 2,3 ppm. Estas señales, se pueden asociar a fragmentos de lípidos y/o macromoléculas. En estudios HR-MAS realizados para otros tipos tumorales, la presencia de estos fragmentos de lípidos se asocia a una proporción significativa de tejido necrótico del fragmento de la biopsia estudiada mediante HR-MAS y, en términos generales, se considera un marcador de malignidad.<sup>35, 38, 40, 43, 49, 50, 167, 169, 170, 175</sup> Sin embargo, la presencia de necrosis en las muestras de adenomas hipofisarios no es frecuente, no se considera un criterio histológico diagnóstico de malignidad y tampoco ha podido ser

correlacionada con una mayor agresividad biológica de los tumores en los que está presente.

Sin embargo, en los espectros 1D CPMG (espectros B y C en la **Figura 21**), la intensidad de las señales anchas mencionadas y asignables a fragmentos de ácidos grasos, va disminuyendo proporcionalmente con respecto a las señales de los metabolitos con T2 más largos (moléculas de bajo peso molecular). Como ejemplo se han etiquetado, con la asignación indicada en la **Tabla 3**, un conjunto significativo de metabolitos más fácilmente identificables en los dos espectros CPMG incluidos en esta figura (en particular en el espectro central (B), con  $\tau = 80$  ms, que permite el filtrado más eficiente de las señales con T2 más cortos). En un primer análisis cualitativo, la resonancia ancha centrada alrededor de 0,9 ppm no parece disminuir (o lo que es lo mismo, ser filtrada por T2), de una manera tan evidente como el resto de señales asociadas a fragmentos de ácidos grasos. Una explicación a dicho comportamiento es que se trate de grupos metilo (CH<sub>3</sub>) de fragmentos lipídicos de menor tamaño y por consiguiente con valores de T2 no tan cortos como los correspondientes al resto de señales de ácidos grasos. En cuanto a las señales de metabolitos de bajo peso molecular su detección y análisis se ve de manera obvia mejorada por el filtrado de la secuencia CPMG, siendo más eficiente cuanto mayor es el valor de  $\tau$ . Así cabe destacar, como ejemplo, la posibilidad de identificar: i) las resonancias de aminoácidos como leucina (6 y 7), valina (9 y 12), alanina (23), lisina (26) y glutamato (38); ii) de lactato (18), de enorme interés a nivel metabólico celular, y con su resonancia casi totalmente solapada en el espectro 1D presaturación (A); iii) de metabolitos relevantes, como GABA (45) y succinato (48); iv) del grupo de compuestos derivados de la colina, con un interés fundamental por estar asociados a procesos de incremento de la celularidad y posiblemente de agresividad para otros tipos tumorales (resonancias 68, 69 y 71);<sup>35, 38, 40, 43, 49, 50, 167, 169, 170, 175</sup> v) de la taurina (74); y como ejemplo final vi) el mioInositol (81) metabolito relacionado con procesos de osmolaridad y al que se ha relacionado para tumores gliales con una mayor agresividad.<sup>35, 38, 40, 43, 49, 50, 51, 174, 175</sup>



**Figura 21.-** Región alifática (0,0 a 5,5 ppm) de tres espectros HR-MAS de una muestra de biopsia (número 50), con diagnóstico clínico de prolactinoma: A) Espectro 1D con presaturación. B) Espectro 1D CPMG con  $t = 80$  ms; C) Espectro 1D CPMG con  $t = 32$  ms. Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.

Los espectros 1D, ya PRESAT o CPMG, contienen toda la información metabólica de las muestras bajo estudio, en este caso muestras de tejido intacto de adenomas hipofisarios, y permiten la identificación y cuantificación de algunas resonancias suficientemente resueltas. No obstante, el solapamiento en los espectros 1D es una limitación importante en el proceso de asignación de resonancias e identificación de algunos metabolitos asociadas a las mismas. En cualquier caso, la información contenida en los espectros monodimensionales proporciona todos los datos necesarios para el análisis estadístico comparativo que permite la separación entre distintos tipos de características que podrán atribuirse a patologías asociadas al tejido o biofluido bajo estudio y con ello el consiguiente apoyo diagnóstico y/o pronóstico. Como ya se ha comentado previamente, esta información se obtiene a partir de la separación de las señales mediante el uso de las técnicas bidimensionales, ya homonucleares,

normalmente  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , o heteronucleares, habitualmente  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . En este trabajo de investigación, el uso de las técnicas de adquisición  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC HR-MAS y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, ha permitido la separación adecuada del máximo número de resonancias (**Figuras 15 y 16**) y la correspondiente identificación de 118 señales y su asignación a 40 metabolitos diferentes. La mayor dispersión de los desplazamientos químicos del  $^{13}\text{C}$  ha permitido la identificación de las 118 señales de forma adecuada en los espectros  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC HR-MAS (**Figura 15**) de las muestras de biopsia de adenomas hipofisarios.

Hasta la fecha, no hemos encontrado referencias bibliográficas relativas a la composición metabólica del tejido de adenomas hipofisarios ni del tejido de la glándula hipofisaria normal. Por consiguiente, en esta tesis se describe por primera vez la composición metabólica global del tejido de adenomas hipofisarios accesible a través del estudio experimental de muestras tumorales intactas, mediante la técnica de RMN HR-MAS, concentraciones  $\geq 0,5$  mM. En la **Tabla 3** del apartado de Resultados se asignan a las 118 resonancias encontradas, los 40 metabolitos identificados.

Se han identificado, con una intensidad limitada, distintos fragmentos de ácidos grasos (p.e. señales 3, 4, 8, 16, 17, 19, 20, 21, 36, 42 y 46. **Tabla 3** y **Figuras 16 y 17**) asociados a la presencia de lípidos. Sólo en las muestras 15 y 50, como posteriormente se discutirá, las intensidades de las señales asociadas a lípidos son superiores que en el resto de las 56 biopsias de adenomas hipofisarios estudiadas. Además de las resonancias correspondientes a los compuestos de Colina (Colina, Fosfatilcolina y Glicerofosfatilcolina, (p.e. resonancias 68, 69 y 71. **Tabla 3** y **Figuras 16 y 17**) de relevante importancia en tejidos tumorales,<sup>35, 167</sup> se han identificado 16 aminoácidos que pueden proporcionar información significativa para el apoyo diagnóstico de los tumores hipofisarios a partir de los datos metabólicos. Concretamente se han podido identificar mediante el uso combinado de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, tal y como se recoge en la **Tabla 3**: a isoleucina, leucina, valina, treonina, lisina, alanina, arginina, glutamina, glutamato, aspartato, ácido aspártico, aspargina, tirosina, fenilalanina, glicina y serina. También se han identificado otros metabolitos como GABA, succinato, ácido succínico, creatina, fosfocreatina, malato, taurina, mio-Inositol, glicerol scio-Inositol,  $\alpha$ -glucosa y  $\beta$ -glucosa, ya previamente identificados en otros tipos de tejidos tumorales, como gliomas y cáncer de mama<sup>35, 167</sup>. También se han identificado metabolitos singulares

como colesterol, glutatión y etanol (este último solamente en dos muestras específicas: 20 y 39).

El conjunto de resonancias identificadas y los correspondientes metabolitos asignados ha sido verificado mediante el análisis comparativo entre los 10 espectros  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC adquiridos. Sólo para 10 de las muestras de biopsia de adenomas hipofisarios estudiadas se contaba con la cantidad de tejido suficiente ( $> 20$  mg) para poder realizar, con el mínimo valor de S/N, los espectros bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, necesarios para la asignación e identificación de los metabolitos. Dichas muestras son: 14 (acromegalia), 17 (acromegalia), 20 (Cushing), 25 (Cushing), 26 (tirotropinoma), 32 (adenoma no funcionante), 33 (adenoma no funcionante), 34 (adenoma no funcionante), 38 (acromegalia), 39 (adenoma no funcionante), 44 (adenoma no funcionante), 53 (adenoma no funcionante) y 57 (Cushing). En general, el número y la distribución de los picos de cruce en los espectros  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC es prácticamente idéntica, aunque no con la misma intensidad, en las 10 biopsias de tumores hipofisarios estudiadas. Como singularidad diferencial la presencia de los picos de cruce a 1,18-19,53 y 3,65-60,15 ppm en los espectros  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC asignados al metabolito etanol sólo se puede observar en las muestras 20 y 39.



## 5.2. ANALISIS CHEMOMÉTRICO GLOBAL MEDIANTE PCA Y PLS-DA

El estudio estadístico comparativo de los perfiles metabólicos de las 58 muestras de biopsias de adenomas hipofisarios se ha llevado a cabo, como se ha descrito en los apartados anteriores, mediante los modelos de análisis de componentes principales (PCA) y proyección de estructuras latentes de análisis discriminante (PLS-DA). Las ventajas principales de ambos modelos es que las principales fuentes de variabilidad en los datos se modelan mediante otras nuevas variables que explican la mayoría de la varianza de los datos, y consecuentemente, respecto a sus valores y cargas, permitiendo la visualización y comprensión de las diferentes características y relaciones entre los datos. Los modelos PLS-DA fueron validados de manera cruzada mediante el método de un dato frente al resto (leave-one-out).<sup>168</sup> Este último método implica el uso de una única observación de la muestra original como el dato a validar, y el resto de observaciones como datos de entrenamiento. Esta metodología se repite de tal forma que cada observación en el conjunto global de la muestra se utiliza una vez como dato a validar. En este trabajo de investigación el conjunto de la muestra está constituido por los espectros de las 58 biopsias de adenomas hipofisarios estudiados. El análisis estadístico mediante PCA y PLS-DA se ha centrado exclusivamente en los espectros 1D PRESAT para los 58 tumores hipofisarios, ya que en dichos espectros está contenida toda la información metabólica sin ningún tipo de modulación. En el método “leave-on-out” para la construcción del modelo PLS-DA, el espectro 1D PRESAT de cada muestra de biopsia de adenoma hipofisario se ha validado respecto al resto de los 57 espectros 1D PRESAT, usados como conjunto de entrenamiento para la diferenciación entre los diferentes tipos de tumores hipofisarios considerados.

### 5.2.1. MODELO ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

El conjunto de los datos de las 58 espectros 1D PRESAT se agruparon en el modelo de análisis de componentes principales (PCA) sin condicionamiento previo, tal y como se recoge en la **Figura 17**. Como se puede observar en la gráfica PCA sin supervisar, aparece una buena separación espontánea entre los tres subtipos de adenomas hipofisarios estudiados para los que se contaba con un número suficiente de muestras: adenomas no funcionantes (21 casos), acromegalia (17 casos) y enfermedad de Cushing (15 casos). No se puede

apreciar una separación para prolactinomas (4 casos), y tirotropinoma (1 caso), debido al insuficiente número de muestras. A partir de la identificación de las 118 señales (**Figura 15**) asignadas a 40 metabolitos (**Tabla 3**) se puede considerar cuales de estos están potencialmente implicados en la separación de los tres grupos mediante los dos componente principales más relevantes, PC1 (eje X) y PC2 (eje Y) de la **Figura 17**.

Específicamente:

- i) La separación en PC1 (Enfermedad de Cushing frente a adenoma no funcionante+acromegalia) está dominada por metabolitos como Lactato, Alanina, Fosfolípidos (señales de diversos ácidos grasos) y azúcares ( $\alpha$ -glucosa y  $\beta$ -glucosa).
- ii) La separación en PC2 (adenoma no funcionante frente a enfermedad de Cushing+acromegalia) tiene contribución más significativa de los metabolitos Glutamina, Glutamato y NAA

### 5.2.2. MODELO PROYECCIÓN DE ESTRUCTURAS LATENTES DE ANÁLISIS DISCRIMINANTE (PLS-DA)

En el modelo PLS-DA, **Figura 18**, la discriminación fue muy buena, superior a PCA, ya que se ha incluido como información adicional el subtipo clínico de adenoma. En este modelo podemos identificar tres “regiones” en las que se agrupan preferentemente las muestras que podemos asignar a cada uno de los subtipos clínicos de adenomas hipofisarios estudiados, para los que se contaba con una mayor número de muestras: adenomas no funcionantes, acromegalia y enfermedad de Cushing, respectivamente.

La sensibilidad y especificidad para cada grupo en validación cruzada es muy próxima al 90%. De hecho, un 90,5% (19/21) de las muestras de adenomas no funcionantes quedaron agrupadas dentro del área que incluye a este tipo de muestras. Asimismo, un 88,2% (15/17) de las muestras de acromegalia se agruparon en la región de componentes del PLSD-DA correspondiente a este

subtipo de adenomas. Finalmente, un 93,3% (14/15) de las biopsias correspondientes al diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing se agruparon dentro del entorno de perfil metabólico asociado a este tipo de adenoma.

Las cinco muestras que no quedaron agrupadas dentro del área teóricamente correspondiente a su subtipo de adenoma hipofisario en función del diagnóstico clínico fueron, por tanto, tres casos de adenomas no funcionantes (casos 31, 45 y 47), un caso de acromegalia (caso 44) y un caso de enfermedad de Cushing (caso 20).

Los resultados referidos resultan de gran interés, dado que muestran que, considerando únicamente los resultados del estudio del perfil metabólico de muestras de biopsia de adenomas hipofisarios, analizadas en este trabajo mediante la técnica de RMN HR-MAS, se pudieron separar con niveles de especificidad  $\geq$  al 90%, los tres diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios para los que se contaba con un número de muestras suficiente: adenomas no funcionantes, acromegalia y enfermedad de Cushing.



### 5.3. CURVAS ROC Y METABOLITOS DIFERENCIADORES

Una vez comprobada, a través de los modelos PCA y PLS-DA, la capacidad de discriminación de la técnica de RMN HR-MAS entre los tres diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios estudiados para los que se contaba con un mayor número de muestras, tal y como quedó reflejado en el apartado resultados, se ha podido identificar 6 regiones de los espectros, en las que se ubican los metabolitos o grupos de metabolitos implicados en su diferenciación, desde un punto de vista metabólico.

- a) Región A (**Figura 19**): 3,205/3,215 ppm. Incluye metabolitos como Colina, Fosfocolina, Arginina y Glicefosfocolina (resonancias 68, 69, 70 y 71 de la **Tabla 3**)
- b) Región B (**Figura 19**): 2,32/2,38 ppm. Incluye metabolitos como GABA, Valina y Glutamato (resonancias 43, 44 y 45 de la **Tabla 3**).
- c) Región C (**Figura 19**): 3,53/3,545 ppm. Incluye metabolitos como mio-Inositol,  $\alpha$ -glucosa y Glicerol (resonancias 81, 82, 83 y 84 de la **Tabla 3**).
- d) Región D (**Figura 19**): 3,88/3,89 ppm. Incluye metabolitos como  $\beta$ -glucosa, Arginina y Aspartato (resonancias 101, 102 y 103 de la **Tabla 3**)
- e) Región E (**Figura 19**): 3,545/3,56 ppm. Incluye metabolitos como Glicerol y Glicina (resonancias 83 y 84 de la **Tabla 3**).
- f) Región F (**Figura 19**): 3,08/3,12 ppm. Incluye metabolitos como Tirosina, Fenilalanina y Etanolamina (resonancias 64, 65 y 67 de la **Tabla 3**).

La importancia de los resultados mostrados en las curvas ROC, radica en la posibilidad de realizar el diagnóstico diferencial basado en los perfiles metabólicos entre los tres subtipos clínicos de adenomas hipofisarios para los que se analizaron un mayor número de muestras mediante la técnica RMN HR-MAS. Con esta base, podemos diferenciar entre muestras tisulares de adenomas hipofisarios no funcionantes, acromegalia y enfermedad de Cushing, con valores de sensibilidad y especificidad muy elevados, que permiten valores predictivos positivos y negativos con muy bajo margen de error.



#### 5.4. ADENOMAS HIPOFISARIOS ATÍPICOS

Los metabolitos derivados de la colina (Co): glicerofosfocolina (GPCo), fosfocolina (PCo) y colina; han sido objeto de particular atención en estudios de espectroscopia por RMN de células cancerígenas y extractos de tejidos, dado que su metabolismo parece estar alterado en las células tumorales.<sup>169</sup> En un estudio de extractos de ácido perclórico sobre muestras tisulares de neoplasias malignas de mama, los diferentes metabolitos derivados de la colina mostraron elevadas concentraciones, al compararlas con las de muestras de tejido adyacente no tumoral.<sup>170</sup> El incremento de la resolución conseguido mediante la utilización de la técnica de espectroscopía HR-MAS permite la identificación de estos diferentes metabolitos derivados de la colina: Co, GPCo y PCo. En estudios realizados sobre cultivos celulares se ha descrito que la concentración de PCo se encuentra aumentada en las células de tumores malignos y que el incremento de la concentración GPCo y la disminución de la de PCo se puede asociar con una menor malignidad.<sup>171</sup> También se han descrito resultados similares para muestras de glioblastomas multiformes con valores para el cociente GPCo/PCo de 0,27 y 0,87, a partir de espectros obtenidos a partir de extractos de tejido (in-vitro) y mediante técnica HR-MAS (ex-vivo), respectivamente. Los valores para los cocientes GPCo/Co y PCo/Co fueron 0,3 y 1,1 para estudios in-vitro y 1,73 y 2 para estudios ex-vivo.<sup>35</sup>

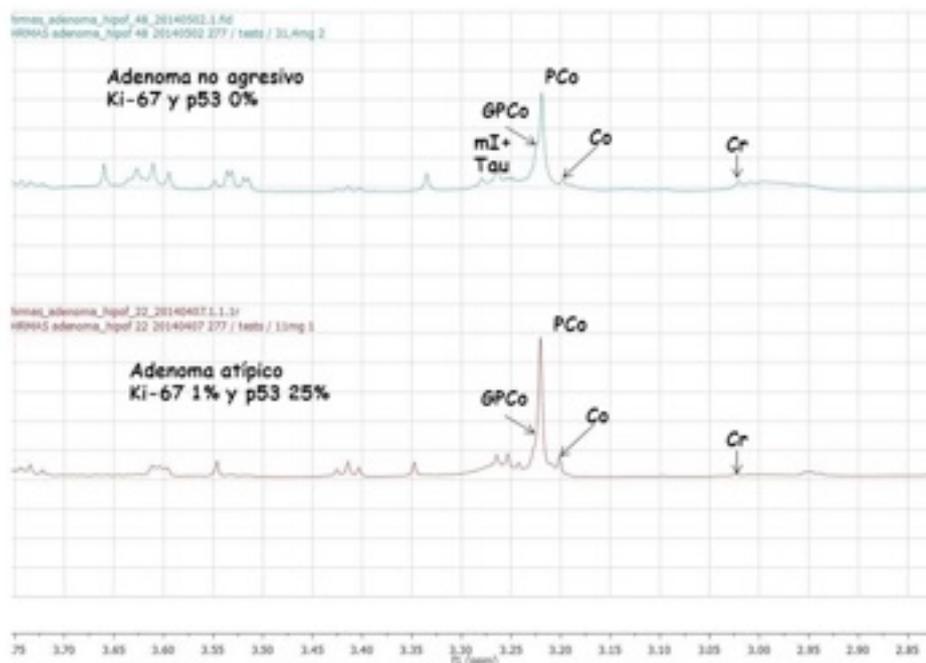
Por lo que se refiere a los tumores hipofisarios, la malignidad es una circunstancia excepcional que viene definida exclusivamente por la demostración de la existencia de metástasis alejadas de la región selar, siendo clasificados en este caso como carcinomas hipofisarios. No obstante, desde el año 2004, la clasificación de la WHO incluye un grupo específico de tumores a los que se denomina adenomas hipofisarios atípicos para los que puede existir una mayor tendencia a la invasión de estructuras vecinas, crecimiento más rápido o mayor tendencia a la recidiva local y, en consecuencia, una mayor dificultad para su control y tratamiento. Los índices mitóticos elevados, con inmunorreactividad frente a Ki 67 o la proteína p53 superiores al 3% constituyen su criterio diagnóstico.<sup>154</sup> Su incidencia se estima en aproximadamente un 10% del total de adenomas hipofisarios.<sup>172</sup>

En nuestra serie no hubo ningún caso de carcinoma hipofisario. Un 12% de los tumores estudiados (7/58) presentaban una inmunorreactividad frente a Ki-67 o p53 superior al 3% y fueron clasificados como adenomas hipofisarios atípicos. Con el fin de intentar descubrir, mediante la utilización de la técnica HR-MAS, la existencia de características metabólicas diferenciales entre el grupo de adenomas hipofisarios y el de adenomas hipofisarios atípicos de nuestra población muestral (58), se realizó un estudio comparativo entre ambos. En el grupo correspondiente a adenomas hipofisarios atípicos incluyó 7 muestras tumorales y en el grupo de adenomas hipofisarios se incluyeron las 51 restantes. Se analizaron para todas ellas las señales de Co, PCo y GPCo y se estimó la proporción de las mismas mediante integración de sus áreas. A partir de las áreas obtenidas se calcularon los cocientes GPCo/PCo, GPCo/Co y PCo/Co. En la tabla 4 se recogen los valores obtenidos para ambos grupos, incluyendo la desviación estándar.

**Tabla 4.-** Valores promedio de los componentes de Colina (DE) estimados a partir de los espectros 1D HR-MAS para las muestras de adenomas hipofisarios atípicos y adenomas hipofisarios.

Adenoma hipofisario	GPCo/PCo	GPCo/Co	PCo//Co
Atípico (7)	0,37 ( $\pm 0,09$ )	1,33 ( $\pm 0,55$ )	3,63 ( $\pm 1,28$ )
Típico (51)	0,52 ( $\pm 0,10$ )	2,06 ( $\pm 0,70$ )	4,15 ( $\pm 1,5$ )

Asimismo y a modo de ejemplo, en la **Figura 22** se muestra la comparación de la región espectral donde resuenan los compuestos de colina para dos muestras: i) parte superior: muestra de adenoma hipofisario con valores de inmunorreactividad frente a Ki-67 y p53 del 0%, Valor de GPCo/PCo = 0,52. ii) parte inferior: muestra de adenoma hipofisario atípico valores de inmunorreactividad frente a Ki 67 del 1% y p53 del 25%. Valor de GPCo/PCo = 0,28.



**Figura 22.-** Ejemplos de espectros 1D PRESAT de dos muestras de adenomas hipofisarios en la región del espectro 2,80-3,75 ppm: i). Parte superior: adenoma hipofisario. ii). Parte inferior: adenoma hipofisario atípico. Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.

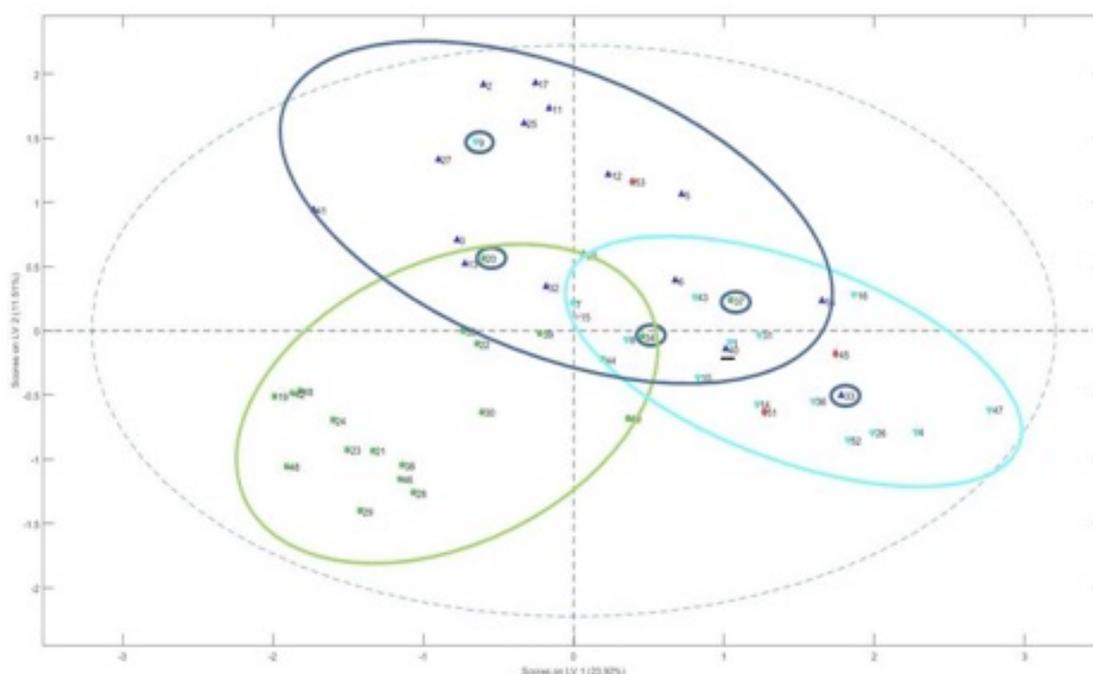
El tamaño de la muestra estudiada no permite la realización de un estudio estadístico del que podamos obtener conclusiones significativas. En cualquier caso, a partir del ejemplo referido y de los datos de la **Tabla 4**, podemos señalar que, al menos a nivel cualitativo, los cocientes GPCo/PCo y GPCo/Co siguen un patrón similar al descrito en estudios previos para otros tejidos tumorales como cáncer de mama o biopsias de glioblastomas multiformes.<sup>35, 167</sup> En nuestro caso, el promedio del valor del cociente GPCo/PCo, fue inferior en las muestras de adenomas atípicos en comparación con el grupo de adenomas hipofisarios. Por lo tanto, el estudio de los valores de los cocientes GPCo/PCo y GPCo/Co podría tener un valor potencial, relacionado con la posibilidad de establecer un diagnóstico metabólico diferencial entre los adenomas hipofisarios y los adenomas hipofisarios atípicos.



## 5.5. CASOS ESPECIALES

Como se ha podido comprobar, el resultado del análisis de las características metabólicas de las 58 muestras de adenomas hipofisarios estudiadas mediante la técnica RMN HR-MAS, ha permitido una muy buena diferenciación entre los tres subtipos clínicos de adenomas hipofisarios, para los que se contaba con un mayor número de muestras en el presente estudio. Esto se ha demostrado al realizar el análisis chemométrico global tanto mediante PCA (**Figura 17**) como, primordialmente PLS-DA (**Figura 18**).

Sin embargo, 5 muestras entre las 58 objeto del estudio, se encuentran localizadas en la gráfica PLS-DA (**Figura 23**), en regiones diferentes a las que corresponderían a su diagnóstico clínico.



**Figura 23.-** Distribución numerada de las 58 muestras de biopsias de adenomas hipofisarios en la gráfica PLS-DA según su diagnóstico clínico y diferenciación y agrupación por perfiles metabólicos ex vivo mediante HR-MAS. Corresponde a la **Figura 18** PLS-DA, donde se señalan rodeadas por círculos, las cinco muestras no

ubicadas en la región de perfil metabólico al que corresponderían por su diagnóstico clínico (numeradas como 9, 20, 33, 34, 37 en la gráfica PLS-DA).

Asimismo, y aunque clasificadas adecuadamente dentro de las regiones que agrupan a las tres categorías más abundantes de adenomas hipofisarios (adenoma no funcionante, acromegalia y enfermedad de Cushing), existen un total de 4 muestras de biopsia, para las cuales el diagnóstico anatómico patológico no fue de adenoma hipofisario sino de tejido hipofisario normal (3 casos) o necrosis (1 caso).

En la **Tabla 5** se recogen los datos correspondientes a estas 9 muestras para las cuales la localización en regiones de PLS-DA no se correspondía con la esperada en función del diagnóstico clínico (5 casos) o para las que el diagnóstico anatómico patológico no fue de adenoma hipofisario (4 casos).

**Tabla 5.-** Casos especiales: fuera del área definida por PLS-DA o con diagnóstico anatómico patológico diferente a adenoma hipofisario.

PLSDA	Caso	Diag	PRL	GH	ACTH	FSH	LH	TSH	Ki67	p53	Invasión
9*	20	4	75	75	20	0	0	0	4	2	2
20*	31	2	1	0	0	0	0	0	1	0	2
33*	44	3	100	75	75	0	0	25	2	1	0
34*	45	2	30	50	75	0	0	0	1	0	3
37*	47	2	0	100	0	0	0	0	1	0	1
54**	58	3	95	100	45	15	95	25	1	3	0
52**	57	4	20	70	30	25	75	30	1	1	0
47**	51	4	30	75	50	20	50	20	2	1	0
39***	49	2	--	--	--	--	--	--	--	--	3

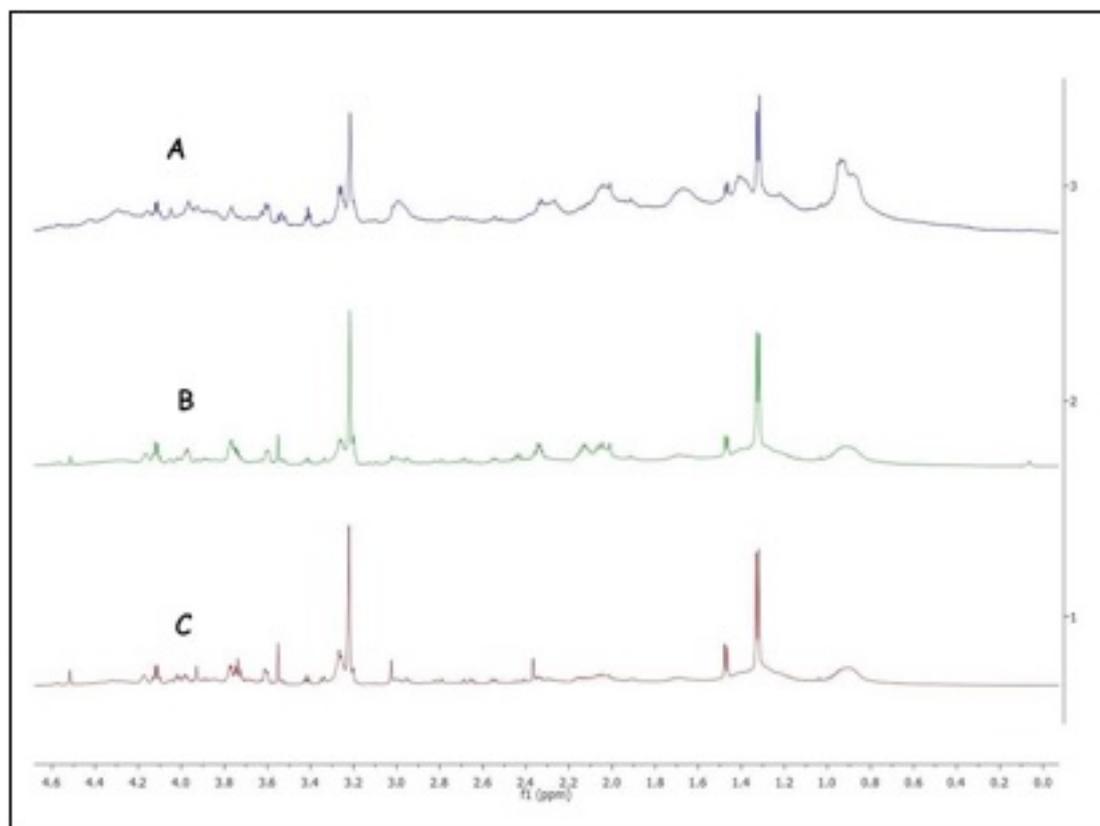
\* Casos desplazados fuera del área definida por PLSDA con relación al diagnóstico clínico de cada subtipo de adenoma hipofisario.

\*\* Casos con diagnóstico anatómico patológico de tejido hipofisario normal.

\*\*\* Caso con diagnóstico anatómico patológico de necrosis.

### 5.5.1 MUESTRAS LOCALIZADAS EN LA GRÁFICA PLS-DA, EN REGIONES DIFERENTES A LAS QUE CORRESPONDERÍAN A SU DIAGNÓSTICO CLÍNICO

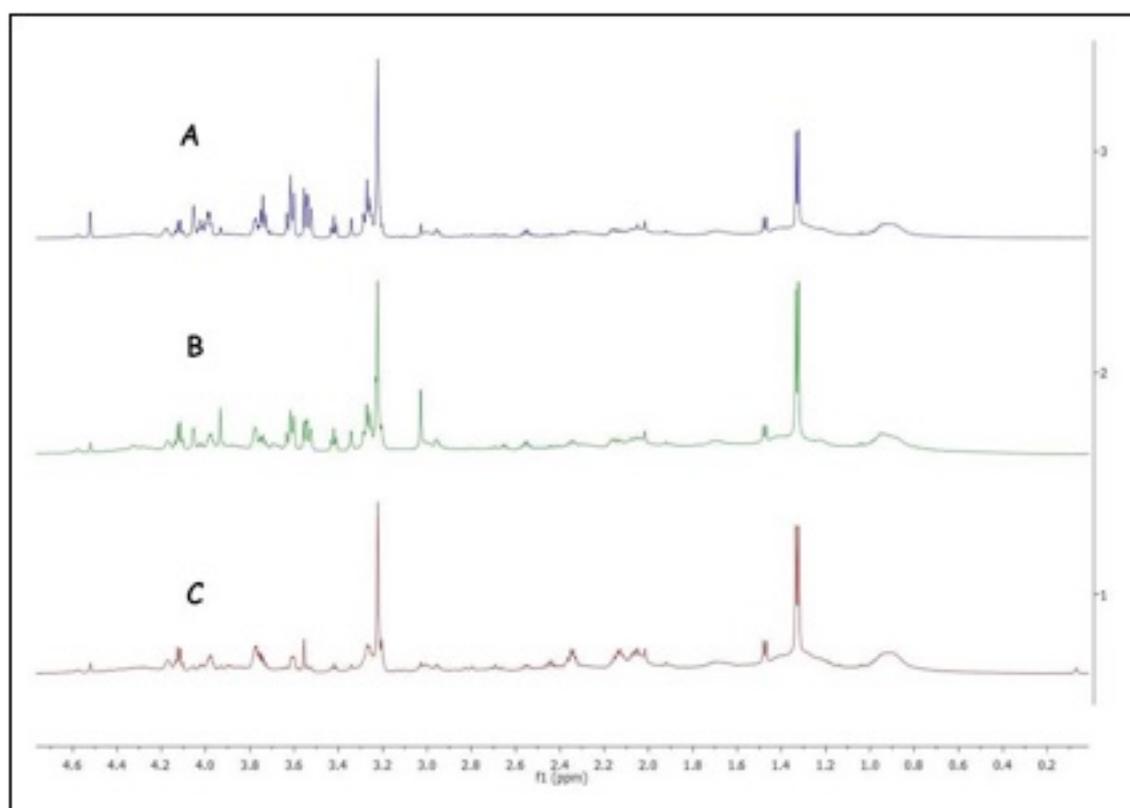
La muestra número 20 corresponde a una enfermedad de Cushing (corticotropinoma). El diagnóstico anatómico patológico fue de adenoma hipofisario con inmunorreactividad particularmente elevada frente a GH (75%) y PRL (75%) y, en menor medida, frente a ACTH (20%). Este caso (muestra identificada con el número 9 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**), se encuentra localizado por su perfil metabólico, en la región correspondiente al más frecuente para las muestras de casos con diagnóstico clínico de acromegalia (**Figura 24**). En este caso particular, parece haber una correlación entre la marcada inmunorreactividad frente a GH por inmunohistoquímica y el perfil metabólico del adenoma estudiado mediante técnica RMN HR-MAS.



**Figura 24.-** Comparación de la región alifática (0,0 – 4,7 ppm) de los espectros 1D PRESAT HR-MAS de tres muestras de biopsia de tres diferentes adenomas hipofisarios: (A) muestra 15 (20,6 mg) con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing y perfil metabólico también correspondiente al más frecuente para adenoma hipofisario tipo Cushing (numerada como 4 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (B) muestra 36 (25,3 mg) con diagnóstico clínico de acromegalia y perfil metabólico.

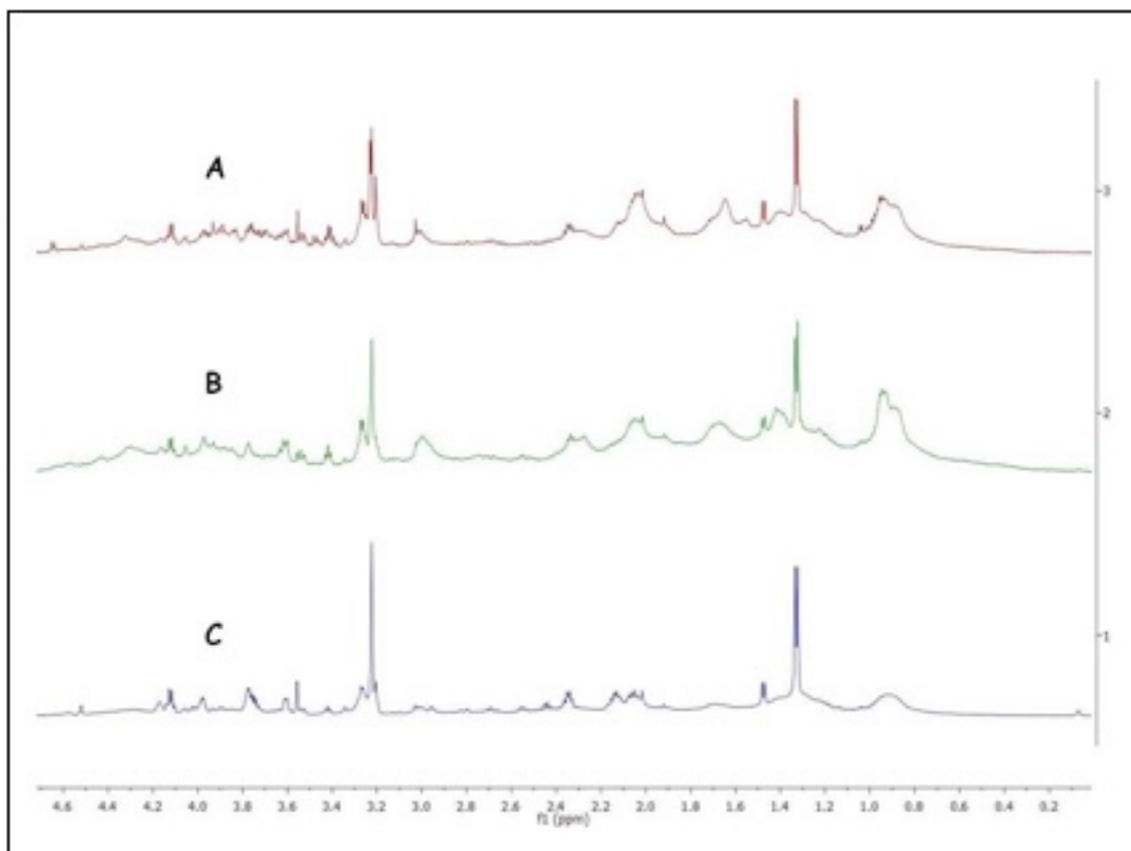
estándar de acromegalia (numerada como 25 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (C) muestra 20 (20,6 mg) con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing y perfil metabólico propio de acromegalia (numerada como 9 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**). Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.

La muestra número 31 corresponde a un adenoma hipofisario no funcionante. El diagnóstico anatómico patológico fue de adenoma hipofisario y en el estudio inmunohistoquímico no existía inmunorreactividad frente a ninguna de las hormonas hipofisarias, por lo que correspondería al subtipo de verdadero adenoma hipofisario no funcionante (null cell). Este caso (muestra identificada con el número 20 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**) se encuentra localizado por su perfil metabólico en la región correspondiente al más frecuente para las muestras de casos con diagnóstico clínico de acromegalia. No obstante, su posición en PLS-DA no es muy distante de la que correspondería para el diagnóstico de adenoma no funcionante y su espectro (**Figura 25**) es similar al típico para el subtipo clínico de adenomas no funcionantes.



**Figura 25.-** Comparación de la región alifática (0,0 – 4,7 ppm) de los espectros 1D PRESAT HR-MAS de tres muestras de biopsias de adenomas hipofisarios: (A) muestra 30 (38,3 mg) con diagnóstico clínico de adenoma no funcionante y con perfil metabólico típico de adenoma hipofisario no funcionante (numerada como 19 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (B) muestra 31 (35,7 mg) con diagnóstico clínico de adenoma no funcionante y con perfil metabólico de adenoma no funcionante (numerada como 20 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (C) muestra 36 (25,3 mg) con diagnóstico clínico de acromegalia y con perfil metabólico típico de acromegalia (numerada como 25 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**). Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.

La muestra número 44 corresponde a una acromegalia. El diagnóstico anatómico patológico fue de adenoma hipofisario. En el estudio inmunohistoquímico existía una elevada inmunorreactividad frente a la práctica totalidad de hormonas hipofisarias: PRL (100%), GH (75%), ACTH (75%) y TSH (25%). Este caso, correspondiente a la muestra número 33 en PLS-DA, se encuentra localizado por su perfil metabólico, en la zona central de la región correspondiente al más frecuente para las muestras de casos con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing. Por lo que respecta a su perfil metabólico (**Figura 26**), comparado con el de casos típicos de enfermedad de Cushing (muestra número 15) y acromegalia (muestra número 36), puede considerarse intermedio entre ambos, aunque más próximo al encontrado para la enfermedad de Cushing. De nuevo en esta ocasión, parece haber una correlación entre inmunorreactividad del tumor frente a las diversas hormonas hipofisarias (similar para GH y ACTH) y el perfil metabólico del adenoma estudiado mediante técnica RMN HR-MAS.

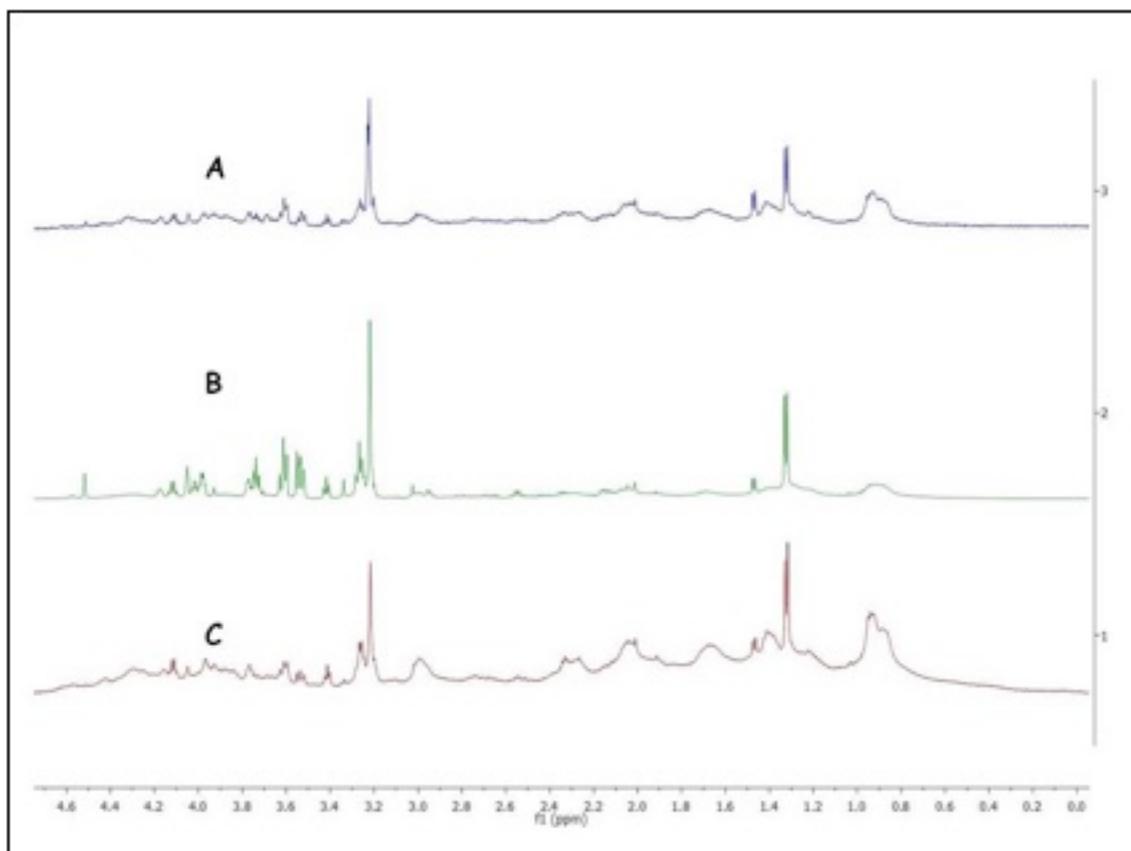


**Figura 26.-** Comparación de la región alifática (0,0 – 4,7 ppm) de los espectros 1D presat HRMAS de tres muestras de biopsias de adenomas hipofisarios: (A) muestra 44 (28 mg), con diagnóstico clínico de acromegalia y con perfil metabólico típico de adenoma hipofisario tipo Cushing (numerada como 33 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (B) muestra 36 (25,3 mg), con diagnóstico clínico de acromegalia y con perfil metabólico estándar de acromegalia (numerada como 25 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (C) muestra 20 (20,6 mg), con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing y con perfil metabólico típico de enfermedad de Cushing (numerada como 9 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**). Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.

La muestra número 45 corresponde a un adenoma hipofisario no funcionante. El diagnóstico anatómico patológico fue de adenoma hipofisario. En el estudio inmunohistoquímico existía una elevada inmunorreactividad frente a ACTH (75%) y, en menor medida, PRL (30%) y GH (50%). Este caso (muestra identificada con el número 34 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**), se encuentra localizado por su perfil metabólico, en la zona próxima a la región correspondiente al diagnóstico clínico de adenoma hipofisario no funcionante, aunque comparte

algunas características metabólicas asociables al perfil de correspondiente al diagnóstico de enfermedad de Cushing. También en este caso, puede haber una correlación entre la elevada inmunorreactividad del tumor frente a ACTH y su perfil metabólico estudiado mediante técnica RMN HR-MAS.

La muestra número 47 corresponde a un adenoma hipofisario no funcionante. El diagnóstico anatómico patológico fue de adenoma hipofisario. En el estudio inmunohistoquímico existía inmunorreactividad frente a ACTH para el 100% de las células tumorales, siendo negativa para el resto de las hormonas hipofisarias. Este caso (muestra identificada con el número 37 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**), se encuentra localizado por su perfil metabólico, en una zona intermedia a las regiones correspondientes al diagnóstico clínico de acromegalia y enfermedad de Cushing. Si bien existe en este tumor una inmunorreactividad del frente a ACTH para el 100% de las células tumorales, la ausencia de la misma frente a GH no justificaría completamente este resultado. En la **Figura 27**, como ejemplo, se incluyen los espectros HR-MAS para esta muestra (espectro localizado en la parte superior de la figura) y los considerados estándar para el diagnóstico clínico de adenoma hipofisario no funcionante y enfermedad de Cushing (espectros localizados en la parte intermedia y parte inferior de la figura, respectivamente).

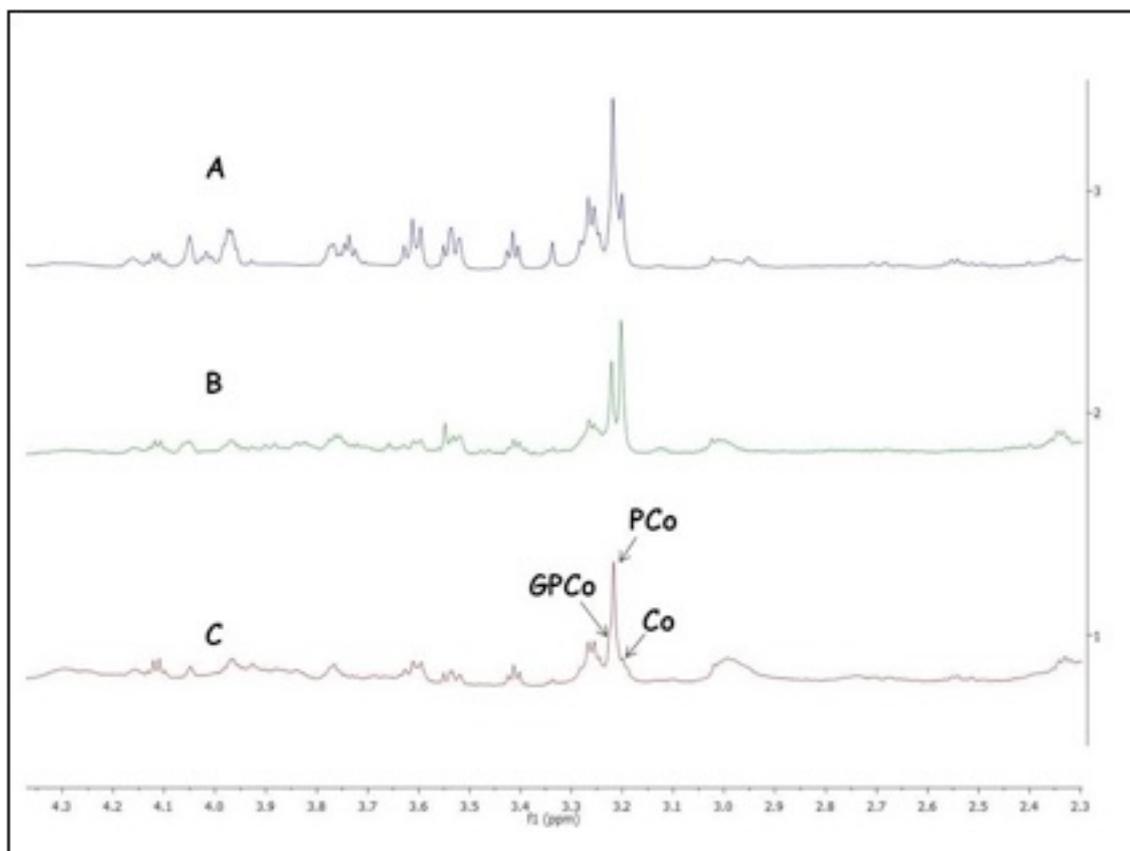


**Figura 27.-** Comparación de la región alifática (0,0 – 4,7 ppm) de los espectros 1D presat HRMAS de tres muestras de biopsias de adenomas hipofisarios: (A) muestra 47 (5,5 mg), con diagnóstico clínico de adenoma no funcionante y perfil metabólico intermedio entre acromegalia y Cushing (numerada como 37 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (B) muestra 30 (38,3 mg), con diagnóstico clínico de adenoma no funcionante y perfil metabólico estándar de adenoma no funcionante (numerada como 19 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (C) muestra 15 (20,6 mg), con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing y con perfil metabólico típico de enfermedad de Cushing (numerada como 4 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**). Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.

### 5.5.2. MUESTRAS PARA LAS QUE EL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO NO FUE DE ADENOMA HIPOFISARIO

Los casos 51 (muestra identificada con el número 47 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**) y 57 (muestra identificada con el número 52 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**), corresponden al diagnóstico clínico enfermedad de

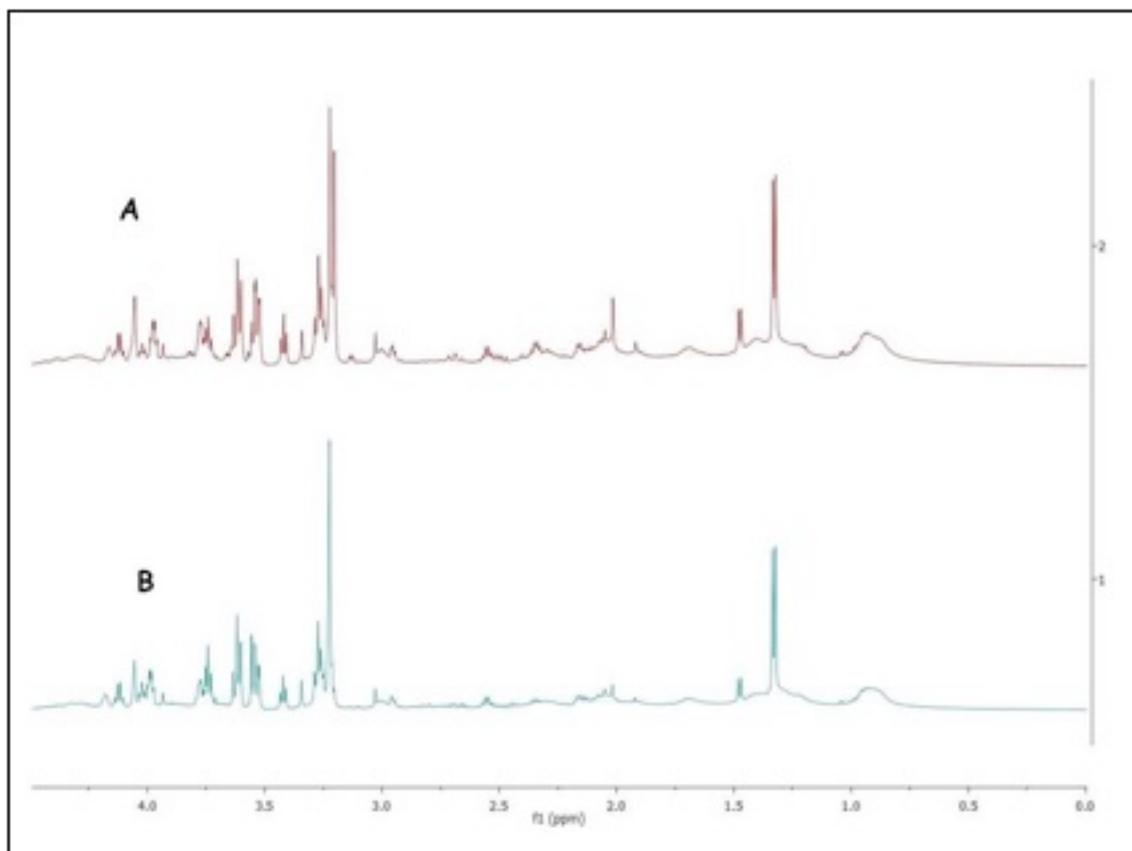
Cushing. El caso 58 (muestra identificada con el número 54 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**), corresponde al diagnóstico clínico acromegalia. Para estos tres casos, el diagnóstico anatómico patológico no fue de adenoma hipofisario sino de tejido hipofisario normal. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, los tres presentaban inmunorreactividad positiva frente a todas las hormonas hipofisarias. Para los dos casos de enfermedad de Cushing existe una inmunorreactividad positiva para ACTH (50% y 30% respectivamente), pero también y predominante para GH (75% y 70% respectivamente). Para el caso de acromegalia existía una inmunorreactividad predominante para PRL y GH (95% y 100% respectivamente) y también para ACTH (45%). Los perfiles metabólicos para las tres muestras son coincidentes con su diagnóstico clínico respectivo: región en la que se agrupan mayoritariamente las muestras correspondientes a enfermedad de Cushing para los casos con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing (casos 51 y 57) y región en la que se agrupan mayoritariamente las muestras correspondientes a acromegalia, para el caso con diagnóstico clínico de acromegalia (caso 58). En los tres casos resulta interesante resaltar la presencia en los espectros de una intensa señal a 3,22 ppm, correspondiente a PCo. La presencia de este metabolito se ha considerado relacionado para otras neoplasias con actividad tumoral, agresividad o incluso malignidad, pero es de significado incierto en nuestro caso, dado que los adenomas hipofisarios son tumores de naturaleza benigna y que, para estos tres tumores en particular, no había datos de su perfil inmunohistoquímico (índices de proliferación celular elevados) que permitiesen catalogarlos como adenomas hipofisarios atípicos.<sup>35, 38, 40, 43, 49, 50, 51, 174, 175</sup>



**Figura 28.-** Comparación de la región alifática (0,0 – 4,7 ppm) de los espectros 1D presat HR-MAS de tres muestras de biopsias de adenomas hipofisarios con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing: (A) muestra 57 (31,1 mg). Diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing. Perfil metabólico Cushing (numerada como 52 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**). Diagnóstico histopatológico de tejido hipofisario normal; (B) muestra 51 (7,8 mg) con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing y perfil metabólico Cushing (numerada como 47 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**). Diagnóstico histopatológico de tejido hipofisario normal. (C) muestra 15 (20,6 mg). Diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing, perfil metabólico típico de Cushing y diagnóstico histopatológico de adenoma hipofisario (numerada como 47 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**). Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.

La muestra número 49 corresponde a un adenoma hipofisario no funcionante. El diagnóstico anatómico patológico no fue de adenoma hipofisario sino de tejido necrótico, por lo que no se realizó estudio inmunohistoquímico. Este caso (muestra identificada con el número 39 en la gráfica PLS-DA. **Figuras**

18 y 23), se encuentra localizado por su perfil metabólico, en la región correspondiente al diagnóstico clínico de adenoma no funcionante.



**Figura 29.-** Comparación de la región alifática (0,0 – 4,7 ppm) de los espectros 1D PRESAT HR-MAS de dos muestras de biopsias de adenomas hipofisarios: (A) muestra 49 (42,3 mg). Diagnóstico clínico de adenoma hipofisario no funcionante y perfil metabólico congruente con el mismo (numerada como 39 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**). Diagnóstico histopatológico de tejido necrótico; (B) muestra 30 (38,3 mg), con diagnóstico clínico de adenoma hipofisario no funcionante, perfil metabólico congruente y diagnóstico anatomo patológico de adenoma hipofisario (numerada como 19 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**). Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.



## 5.6. SEÑAL DE ACIDOS GRASOS O LIPIDOS

La muestra número 50 corresponde a un prolactinoma con diagnóstico histopatológico de adenoma hipofisario e inmunorreactividad frente a PRL (95%) y GH (20%), con índices de proliferación celular negativos (0% frente a Ki 67 y p53). Este caso (muestra identificada con el número 39 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**), se encuentra localizado por su perfil metabólico, en la región correspondiente al diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing. En él resulta llamativa una característica del espectro distinta a las del resto de muestras comentadas y que consiste en la presencia de un número significativo de resonancias anchas con intensidad elevada (**Figura 29**). Concretamente, los máximos de dichas señales aparecen respectivamente a 0,90, 1,29, (la de mayor intensidad), 1,58, 2,04, 2,25, 2,80 y 5,53 (no mostrada en la expansión del espectro) ppm. Estas resonancias se han asignado, mediante la simulación teórica de desplazamientos químicos, a diferentes fragmentos de ácidos grasos de hasta 8 átomos de carbono, pudiéndose identificar los grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ), metileno ( $\text{CH}_2$ ),  $-\text{CH}=\text{}$  y  $=\text{CH}-$  (**Tabla 2**, referencia 1).

La señal de ácidos grasos o lípidos puede aparecer en los espectros de RMN in-vivo (ERMI) y ex-vivo (HR-MAS) de dos diferentes maneras: i) cuando la proporción mayoritaria en el estudio no corresponde a lípidos, se produce una distorsión en la línea base del espectro que es tanto mayor, cuanto mayor es la concentración de ácidos grasos en la muestra estudiada. ii) cuando la proporción de lípidos es mayoritaria en la muestra bajo estudio, sus señales son visibles en el espectro con las mayores intensidades del mismo. Se ha comprobado que el análisis estadístico comparativo de las características de los espectros 1D PRESAT mediante HR-MAS, permite una evaluación del tipo y concentración de metabolitos en la muestra de tejido estudiada.<sup>171, 172</sup> De hecho, la demostración de la presencia de señales intensas de lípidos en ERMI se ha considerado para algunos tipos tumorales como un claro indicador de la presencia de necrosis y también, el análisis cuantitativo de los cocientes de las señales de lípidos a 0,9 y 1.2 ppm con respecto a las señales de creatina (Cr) o  $\text{H}_2\text{O}$ , han permitido una diferenciación entre tres tipos de tumores gliales: astrocitomas, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas multiformes.<sup>35, 38, 171-173</sup> En nuestro estudio de espectroscopia ex vivo HR-MAS sobre 58 muestras de cinco diferentes subtipos de adenomas hipofisarios, se detectó la presencia de lípidos, con una concentración no mayoritaria en dos de las

muestras estudiadas (15 y 50), sin que existiese por otra parte una correlación con la presencia de necrosis desde un punto de vista anatómico patológico. Estos datos, carentes de significación estadística por el pequeño tamaño muestral y el hecho de que los adenomas hipofisarios son tumores benignos desde un punto de vista biológico, hacen que la presencia de lípidos (con señales de ácidos grasos visibles) en el perfil metabólico de las muestras, no parezca tener una influencia apreciable en la clasificación o el pronóstico de los adenomas hipofisarios estudiados.

## 5.7. PROLACTINOMAS

Cuatro (6,89%) de los adenomas hipofisarios estudiados eran prolactinomas. El número de muestras disponibles para su estudio, tanto en nuestro caso como en series amplias de la literatura, es menor que para otros subtipos de adenomas hipofisarios, dado que se trata del único de ellos para el cual existe un tratamiento médico de elección como primera opción terapéutica.<sup>81-84, 157, 174</sup> Las características inmunohistoquímicas de nuestro grupo de prolactinomas se recogen en la **Tabla 6**.

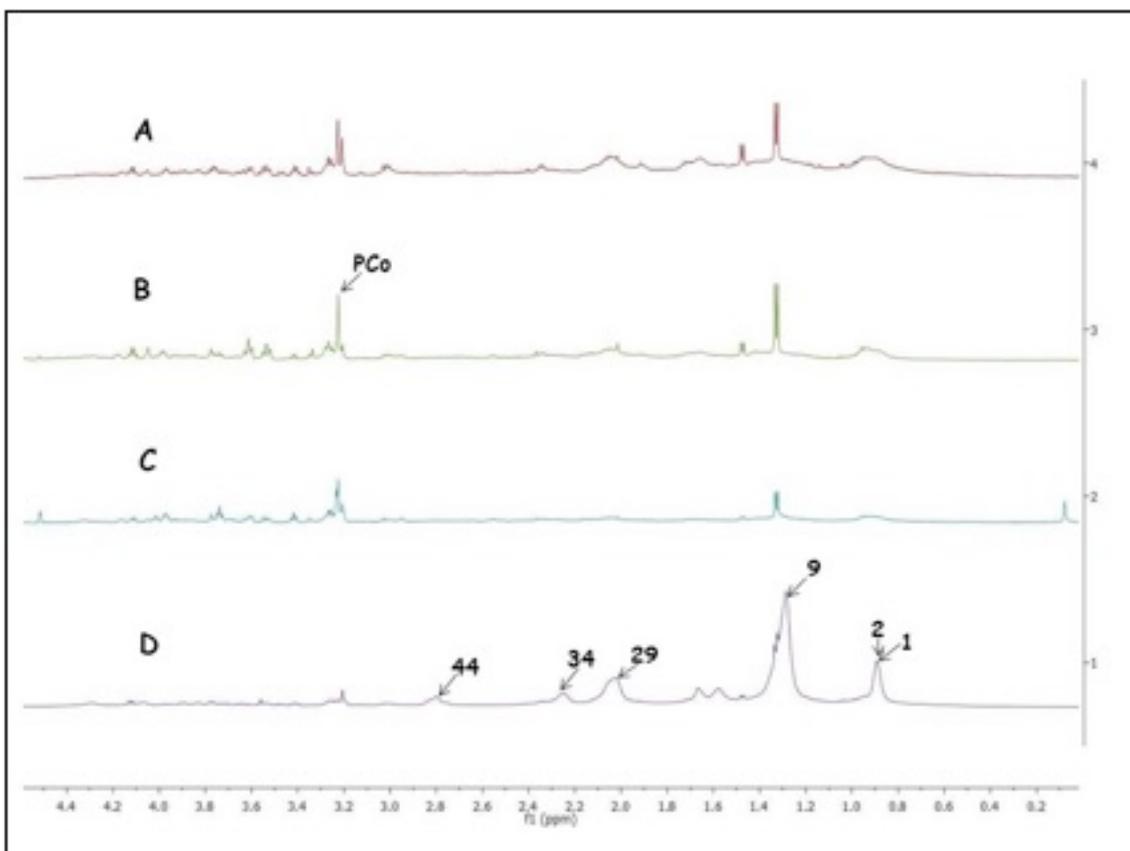
**Tabla 6.-** Características inmunohistoquímicas de los 4 prolactinomas estudiados.

PLSDA	Caso	Diag	PRL	GH	ACTH	FSH	LH	TSH	Ki-67	p53
53	56	1	0	75	20	10	15	10	3	0
50	54	1	100	95	0	0	0	0	15	5
51	55	1	100	50	0	0	0	0	2	1
45	50	1	95	20	0	0	0	0	0	0

Aunque el pequeño tamaño muestral no permite obtener datos estadísticamente significativos, cabe destacar con relación al perfil metabólico de estos cuatro tumores que: i) no se encuentran agrupados. ii) Dos de ellos, los casos 56 y 54 (muestras identificadas con los números 53 y 50 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**) se encuentran localizados en la región donde se agrupan preferentemente los perfiles metabólicos de los adenomas con diagnóstico clínico acromegalia, mientras que los dos restantes, casos 55 y 50 (muestras identificadas con los números 51 y 45 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**) se localizaron en la región correspondiente a los que tenían el diagnóstico clínico enfermedad de Cushing. En los dos primeros casos, apuntaría a una correlación con su elevada inmunorreactividad frente a GH (75% y 95% respectivamente), pero no quedaría confirmado para los dos restantes, que no presentaban inmunorreactividad frente a ACTH (0% en ambos casos).

Es de destacar el resultado del perfil metabólico para el caso número 54 (muestra identificada con el número 50 en la gráfica PLS-DA. **Figuras 18 y 23**), localizado en la región donde se agrupan preferentemente los perfiles metabólicos de los adenomas con diagnóstico clínico de acromegalia. El diagnóstico anatómico patológico fue de adenoma hipofisario atípico, presentando índices mitóticos muy elevados (15% para Ki 67 y 5%

para p53). En el estudio inmunohistoquímico para hormonas hipofisarias existía inmunorreactividad frente a PRL (100%) y GH (90%), siendo negativa para las restantes. Desde el punto de vista clínico se trató de un tumor de comportamiento biológico muy agresivo, marcado por sus manifestaciones clínicas, su gran invasividad local y su tendencia a un rápido crecimiento a pesar de las diferentes medidas terapéuticas aplicadas. Clínicamente presentaba cefalea, hipopituitarismo, parálisis de óculo-motores y epilepsia. Radiológicamente existía una gran invasión de estructuras del área paraselar y un crecimiento intracraneal con ocupación de la cisterna silviana izquierda e imagen de invasión del lóbulo temporal adyacente. El tumor fue resistente a tratamiento médico con agonistas dopaminérgicos y terapia combinada y el paciente tuvo que ser intervenido en tres ocasiones en un corto lapso de tiempo por rápido crecimiento tumoral tras cada una de las cirugías. Fue tratado también con radioterapia tras la tercera cirugía, sin conseguir el control de la enfermedad. Finalmente fue tratado con quimioterapia (temozolomida), tras la cual la lesión residual permaneció estable y sin nuevo crecimiento durante un periodo de 60 meses hasta la actualidad. El perfil metabólico de esta muestra se caracteriza por una señal muy elevada de PCo (a 3,22 ppm. Espectro B. **Figura 29**), indicativa de la presencia de una mayor concentración de este metabolito, en comparación con GPCo (3,23 ppm) y Co (3,20 ppm) y con relación a los perfiles metabólicos de los tres prolactinomas restantes, correspondientes a adenomas hipofisarios típicos desde el punto de vista histopatológico.



**Figura 29.-** Comparación de la región alifática (0,0 – 4,7 ppm) de los espectros 1D presat HR-MAS de las 4 muestras de biopsias de adenomas hipofisarios con diagnóstico clínico de prolactinoma: (A) Caso 56 (9,1 mg), con perfil metabólico dentro de la región acromegalia (numerada como 53 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (B) Caso 54 (7,5 mg), con perfil metabólico dentro de la región acromegalia (numerada como 50 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (C) Caso 55 (3,9 mg), con perfil metabólico dentro de la región tipo enfermedad de Cushing (numerada como 51 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**); (D) Caso 50 (35,2 mg), correspondiente a un adenoma hipofisario atípico, con un comportamiento clínico y biológico muy agresivo, perfil metabólico dentro de la región tipo enfermedad de Cushing (numerada como 45 en la gráfica PLS-DA. **Figura 18**), y con un elevado contenido en señales anchas de fragmentos de ácidos grasos, etiquetados según la **Tabla 2**. Eje de abscisas: desplazamiento químico en ppm. Eje de ordenadas: unidades de intensidad arbitrarias.



## 5.8. COMPARACIÓN MALDI-Tof

Recientemente se ha propuesto, a través de una prueba de concepto, la utilización de la técnica de espectrometría de masas de ionización/desorción mediante láser aplicado a una matriz (MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization) para determinar de manera rápida la composición de péptidos y proteínas hormonales en biopsias de tumores hipofisarios.<sup>177</sup> Asimismo, se incluye la técnica de imagen MALDI (MSI) para delimitar la composición de péptidos y proteínas hormonales dentro de los tejidos de biopsia.<sup>177</sup> La prueba de concepto MALDI-MSI se aplicó en seis muestras de biopsia no patológicas (NP) y 45 muestras de biopsia de adenomas hipofisarios tanto funcionantes como no funcionantes. La técnica MALDI y MALDI-MSI se ha desarrollado particularmente para la detección de hormonas hipofisarias estándar mediante análisis inmunohistoquímico, como prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH). En este estudio los resultados del análisis estadístico PCA permitieron una adecuada diferenciación entre: cuatro muestras de corticotropinomas frente a las seis muestras no patológicas; 5 muestras de somatotropinomas y cuatro muestras de tumores con secreción mixta (GH-PRL) frente a las seis muestras no patológicas; 5 muestras de gonadotropinomas (FSH-LH) y 5 muestras de adenomas hipofisarios no funcionantes frente a las seis muestras no patológicas; y de tres tipos diferentes de adenomas hipofisarios funcionantes (4 corticotropinomas, 5 somatotropinomas y 2 prolactinomas) frente a 5 muestras de adenomas hipofisarios no funcionantes. A priori, la aproximación propuesta como prueba de concepto, presenta el interés de una determinación rápida del contenido en péptidos y hormonas proteicas de manera directa en el tejido de las biopsias de adenomas hipofisarios. No obstante, no se muestran resultados relativos a la correlación de los espectros de masas MALDI-MSI con el diagnóstico clínico, que en un elevado porcentaje de casos no es coincidente con el resultado de los datos inmunohistoquímicos.<sup>177</sup>

A modo de ejemplo, en la **Tabla 7** se recogen los datos de las muestras estudiadas en esta tesis con diagnóstico clínico no directamente relacionado con los porcentajes de los distintos valores de la inmunohistoquímica.

**Tabla 7.-** Datos clínicos (1 = Prolactinoma; 2= No Funcionante; 3 = Acromegalia; 4 = Cushing y 5 = Tirotropinoma) y de inmunohistoquímica para aquellas muestras con mínima o nula correlación entre ambos.

PLSDA	Caso	Diagnóstico	PRL	GH	ACTH	FSH	LH	TSH	Ki-67	p53
1	12	4*	100	100	5	0	0	0	2	1
2	13	3*	100	100	0	0	0	0	1	0
4	15	4*	50	100	100	0	0	0	0	0
5	16	3*	100	100	0	0	0	0	1	1
7	18	4*	10	100	25	0	0	0	0	0
8	19	4*	0	90	0	0	0	0	7	1
9	20	4**	75	75	20	0	0	0	4	2
10	21	4*	0	0	5	0	0	0	1	0
12	23	3*	100	100	0	0	0	0	5	10
14	25	4*	0	50	20	0	0	0	2	1
16	27	4*	5	40	20	0	0	0	1	0
26	37	4*	0	100	4	0	0	0	2	0
31	42	4*	95	95	0	95	95	50	1	1
33	44	3**	100	75	75	0	0	25	2	1
34	45	2*	30	50	75	0	0	0	1	0
37	47	2**	0	0	100	0	0	0	1	0
47	51	4*	30	75	50	20	50	20	2	1
53	56	1***	0	75	20	10	15	10	3	0
52	57	4*	20	70	30	25	75	30	1	1

Al analizar en nuestro trabajo la correlación entre el diagnóstico clínico y los resultados de la inmunohistoquímica realizada como parte del diagnóstico histopatológico de las muestras tumorales, se pone de manifiesto que en 19 de los casos no existía una correcta correlación entre ambos, tratándose de un resultado concordante con lo previamente descrito en la literatura.<sup>178</sup> Sin embargo, cuando correlacionamos para estas mismas muestras el diagnóstico clínico con los perfiles

metabólicos obtenido a partir de los estudios HR-MAS, observamos que para 15 de las 19 muestras, se obtuvo una adecuada diferenciación mediante sus perfiles metabólicos a partir del diagrama PLSDA (**Figura 18**) y unos elevados valores de las curvas ROC (**Figura 20**).



## 6. CONCLUSIONES



1.- El resultado del análisis del perfil metabólico de adenomas hipofisarios, obtenido a partir del estudio ex-vivo de 58 muestras intactas de este tipo de tumores, utilizando la técnica de RMN HR-MAS, nos ha permitido describir un perfil metabólico para ellos, definido por la presencia de 40 metabolitos identificados a partir de la asignación de 118 resonancias.

2.- Se ha podido contrastar, a partir de la comparación entre los espectros  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC en las 10 muestras de biopsia de tumores hipofisarios para las que se contaba con una cantidad suficiente de tejido ( $\geq 20$  mg), que la composición metabólica cualitativa es prácticamente idéntica para las muestras de adenomas hipofisarios con diagnóstico clínico de adenoma no funcionante, acromegalia y enfermedad de Cushing.

3.- Entre los 40 metabolitos identificados se han encontrado, entre otros, 16 aminoácidos, compuestos de Colina, fragmentos de ácidos grasos, GABA, compuestos de Inositol,  $\alpha$  y  $\beta$ -glucosa, glutatión, etanolamina, colesterol, glicerol y ornitina. Asimismo, en dos biopsias se ha podido identificar también etanol. El modelo de Análisis de Componentes Principales (PCA) sin supervisar permite una separación espontánea inicial adecuada entre los tres subtipos clínicos de adenomas hipofisarios para los que se contaba con un mayor número de muestras.

4.- El modelo de Análisis de Componentes Principales (PCA) sin supervisar, permite una separación espontánea inicial adecuada entre los tres subtipos clínicos de adenomas hipofisarios para los que se contaba con un mayor número de muestras.

4.1.- La separación en el componente principal 1 PC1 en PCA, permite la discriminación de muestras de adenomas con diagnóstico clínico de enfermedad de Cushing con respecto a adenomas no funcionante+acromegalia, dominada predominantemente por: Lactato, Alanina, Fosfolípidos y  $\alpha$ -glucosa y  $\beta$ -glucosa.

4.2.- La separación en el componente principal 2 PC2 en PCA, permite la discriminación de muestras de adenomas con diagnóstico clínico no funcionante con respecto a acromegalia+enfermedad de Cushing, dominada predominantemente por: Glutamina, Glutamato y NAA.

5.- El análisis del modelo PLSDA supervisado nos ha permitido separar tres “regiones”, bien definidas, caracterizadas por las siguientes peculiaridades de perfil metabólico:

5.1.- “Región” de adenomas no funcionantes: tumor con el metabolismo más proliferante (composición en compuestos de Colina) y en parte más relacionado con la agresividad tumoral a partir de la variación en el contenido de Lactato, Glutación y NAA.

5.2.- “Región” de acromegalia: aparecen niveles alterados de Fenilalanina y Tirosina, precursores de catecolaminas.

5.3.- “Región” de enfermedad de Cushing: perfil metabólico similar a acromegalia, aunque con diferencias significativas en varios metabolitos: GABA, Isoleucina, Leucina y Valina.

6.- La aplicación del cálculo estadístico ANOVA a las 40 regiones de los 58 espectros 1D presat, ha permitido obtener 6 regiones (A, B, C, D, E, F, G. **Figura 19**) con valores  $p < 0,05$  para la diferenciación entre los diferentes subtipos clínicos de adenomas hipofisarios.

6.1.- Los metabolitos responsables de la correlación ANOVA significativa entre el perfil metabólico y el diagnóstico clínico de diferentes subtipos de adenomas hipofisarios son, fundamentalmente: compuestos de Colina, Arginina, GABA, Valina, Glutamato, mio-Inositol,  $\alpha$  y  $\beta$ -glucosa, Aspartato, Glicerol, Glicina, Tirosina, Fenilalanina y Etanolamina.

7.- Los valores de las curvas ROC son muy altos ( $> 0,90$ ) para los tres componentes principales correspondientes a las tres regiones con valor de  $p$  más pequeño ( $< 10^{-5}$ ), estableciendo diferencias entre muestras tisulares de adenomas hipofisarios no funcionantes, acromegalia y enfermedad de Cushing, con valores de sensibilidad y especificidad muy elevados, que permiten valores predictivos positivos y negativos con muy bajo margen de error.

8- El perfil metabólico obtenido a partir del estudio ex vivo de 58 muestras intactas de cinco diferentes subtipos de adenomas hipofisarios, utilizando la técnica de RMN

HRMAS, mostró una adecuada correlación entre estos y su diagnóstico clínico. Son características singulares de la técnica HR-MAS su rapidez, robustez, objetividad, reproducibilidad y fácil automatización. Por estos motivos consideramos que este trabajo aporta una base inicial para poder proponer la inclusión de la técnica HR-MAS como herramienta adicional en la caracterización diagnóstica de los adenomas hipofisarios. Del mismo modo, la implementación de esta técnica junto con los avances tecnológicos en el ámbito de la RMN, puede hacer posible en el futuro avances en el campo del diagnóstico, como la espectroscopia in-vivo mediante RMN.



## 7. BIBLIOGRAFÍA



1. Muñiz P. Tecnologías ómicas y bioinformática para la investigación biomédica. *Electron J Biomed* 2011; 3: 6-8.
2. Patel L, Parker B, Yang D, Zhang W. Translational genomics in cancer research: converting profiles into personalized cancer medicine. *Cancer Biology and Medicine* 2013; 10 (4): 214-222.
3. Chin L, Andersen JN, Futreal PA. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. *Nature Medicine* 2011; 17: 297-303.
4. Heidecker B, Hare JM. The use of transcriptomic biomarkers for personalized medicine. *Heart Fail Rev* 2007; 12 (1): 1-11.
5. Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Moghaddas A, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* 2014. 509: 582-587.
6. Roessner U, Bowne J. What is metabolomics all about? *Biotechniques* 2009; 46 (5): 363-365.
7. Frédérick M, Pirotte B, Fillet M, de Tullio P. Metabolomics as a challenging approach for medicinal chemistry and personalized medicine. *J Med Chem* 2016; 59 (19): 8649-8666.
8. Abu-Asab MS, Chaouchi M, Alesci S, Galli S, Laassri M, Cheema AK, et al. Biomarkers in the age of omics: time for a systems biology approach. *OMICS* 2011; 15 (3): 105-112.
9. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al: HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acid Res* 2007; 35 (Database issue): D521-D526.
10. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Eisner R, Young N, Gautam B, et al. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acid Research* 2009; 37 (Database issue): D603-D610.
11. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0: The human metabolome database in 2013. *Nucleic Acid Res* 2013; 41 (Database issue): D801-D807.
12. Ulrich EL, Akutsu H, Doreleijers JF, Harano Y, Ioannidis YE, Lin J, et al. BMRDB (Biological Magnetic Resonance Data Base). "BioMagResBank". *Nucleic Acid Res* 2008; 36 (Database issue): D402-D408.
13. Kosmidis AK, Kamisoglu K, Calvano SE, Corbett SA, Androulakis IP. Metabolomic fingerprinting: challenges and opportunities. *Crit Rev Biomed Eng* 2013; 41 (3): 205-221.

14. Fiehn O, Sparger J. Use of metabolomics to discover metabolic patterns associated with human diseases. En: Harrigan GG, Goodacre R, editores. *Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis*. 1ª edición. USA. Springer US. 2003, pp 199-215.
15. Gibney M, Walsh M, Brennan L, Roche HM, German B, van Ommen B. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *Am J Clin Nutr* 2005; 82 (3): 497-503.
16. Gomez-Casati DF, Zanol MI, Busi MV. Metabolomics in plants and humans: applications in the prevention and diagnosis of diseases. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 792527. Doi: 10.1155/2013/792527.
17. Kell DB, Goodacre R. Metabolomics and systems pharmacology: why and how to model the human metabolic network for drug discovery. *Drug Discov Today* 2014; 19 (2): 171-182.
18. Sarwal MM, Benjamin J, Butte AJ, Davis MM, Wood K, Chapman J. Transplantomics and biomarkers in organ transplantation: a report from the first international conference. *Transplantation* 2011; 91 (4): 379-382.
19. Barnes S, Benton HP, Casazza K, Cooper SJ, Cui X, Du X. Training in metabolomic research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data. *JMS* 2016; 51(7): 461-475.
20. Ringnér M. What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* 2008; 26 (3): 303-304.
21. Nyamundanda G, Brennan L, Gormley IC. Probabilistic principal component analysis for metabolic data. *BMC Bioinformatics* 2010; 23 (11): 571. doi: 10.1186/1471-2105-11-571.
22. Martel D, Koon TV, Fur YL, Ratiney H. Localized 2D COSY sequences: method and experimental evaluation for a whole metabolite quantification approach. *JMR* 2015; 260: 98-108.
23. Cloarec O, Dumas ME, Craig A, Barton RH, Trygg J, Hudson J, et al. Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic 1H NMR data sets. *Anal Chem* 2005; 77 (5): 1282-1289.
24. Dona AC, Kyriakides M, Scott F, Shephard EA, Varshavi D, Veselkov K, et al. A guide to the identification of metabolites in NMR-based

- metabonomics/metabolomics experiments. *Comput Struct Biotechnol J* 2016; 14: 135-153.
25. Bloch F, Hansen WW, Packard M. The nuclear induction experiment. *Phys Rev* 1946; 70: 474-486.
  26. Gardner JH, Purcell EM. A precise determination of the proton magnetic moment in Bohr magnetons. *Phys Rev* 1949; 76: 1262.
  27. Rico M. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de alta resolución: una herramienta fundamental en química y biología estructural. *An Quim* 2011; 107 (1): 46-57.
  28. Slichter CP. Principles of magnetic resonance. 3<sup>rd</sup> enlarged and updated edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1996.
  29. Chernoff D, Stark P. Principles of magnetic resonance imaging. In: UpToDate, Muller NL, Yeon SB (Eds), UpToDate, Waltham, MA. (Accessed on December 05, 2016).
  30. Cousin SF, Charlier C, Kaderavék P, Marquardsen T, Tyburn JM, Bovier PA, et al. High resolution two-field magnetic resonance spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys* 2016; Nov 28 [Epub ahead of print].
  31. Andrew ER, Bradbury A, Eades RG. Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed. *Nature* 1958;182: 1659.
  32. Lowe IJ. Free induction decays of rotating solids. *Phys Rev Lett* 1959; 285-287.
  33. Andrew ER. Magic angle spinning. *International Reviews in Physical Chemistry* 1981; 1: 195-224.
  34. Moka D, Vorreuther R, Schicha H, Spraul M, Humpfer E, Lipinski M, et al. Magic angle spinning proton nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of intact kidney tissue samples. *Anal Comm* 1997; 34:107-109.
  35. Martínez-Bisbal MC, Martí-Bonmatí L, Piquer J, Revert AJ, Ferrer P, Llácer JL, et al. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C HR.MAS spectroscopy of intact biopsy samples ex vivo and in vivo <sup>1</sup>H MRS study of human high grade gliomas, *NMR in Biomedicine* 2004; 17: 191-205.
  36. Pascual-Lozano AM, Martínez-Bisbal MC, Boscá-Blasco I, Valero-Merino C, Coret-Ferrer F, Martí-Bonmatí L, et al. Total brain T2-hyperintense lesion-volume and the axonal damage in the normal-appearing white matter of brainstem in early lapsing-remitting multiple sclerosis. *Rev Neurol* 2007; 45(8): 468-473.

37. Martínez-Bisbal MC, Arana E, Martí-Bonmatí L, Celda B. Cognitive impairment in Alzheimer disease, vascular dementia, mild cognitive impairment and depression. A <sup>1</sup>H MR spectroscopy study. *European Journal of Neurology*, 2004; 11:187-193.
38. Martínez-Bisbal MC, Celda B. Proton magnetic resonance spectroscopy imaging in the study of human brain cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 53(6): 618-630.
39. Du F, Cooper AJ, Thida T, Sehovic S, Lukas SE, Cohen BM, et al. In vivo evidence for cerebral bioenergetics abnormalities in schizophrenia measured using <sup>31</sup>P magnetization transfer spectroscopy. *JAMA Psychiatry* 2014; 71 (1): 19-27.
40. Monleon D, Martínez-Bisbal MC, Martínez-Granados B, Esteve V, Ferrer-Luna R, Mata M, et al. Brain tumour diagnosis and prognosis by in vivo <sup>1</sup>H MRS and ex vivo metabolomic and genomic data. A prospective study as part of eTUMOUR (FP6-2002-LSH503094). *European Radiology* 2006; 16 (S1), 451.
41. Cheng LL, Ma MJ, Becerra L, Ptak T, Tracey I, Lackner A, et al. Quantitative neuropathology by high resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94 (12): 6408-6413.
42. González-Bonet LG. Biopsia estereotáctica frente a espectroscopia en gliomas de alto grado de malignidad. Revisión de la bibliografía. *Rev Neurol* 2008; 47 (6): 310-314.
43. Carpinelli G, Carapella CM, Palombi L, Raus L, Caroli F, Podo F. Differentiation of glioblastoma multiforme from astrocytomas by in vitro <sup>1</sup>H MRS analysis of human brain tumors. *Anticancer Res*; 1996; 16 (3B): 1559-1564.
44. Kinoshita Y, Kajiwara H, Yokota A, Koga Y. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors: an in vitro study. *Neurosurgery* 1994; 35 (4): 613-614.
45. Pascual JM, Carceller F, Cerdán S, Roda JM. Diagnóstico diferencial de tumores cerebrales “in vitro” por espectroscopía de resonancia magnética de protón. Método de los cocientes espectrales. *Neurocirugía* 1998; 9: 4-10.
46. Vicente J, Fuster-Garcia E, Tortajada S, García-Gómez JM, Davies N, Natarajan K, et al. Accurate classification of childhood brain tumours by in vivo <sup>1</sup>H MRS-A multi-centre study. *Eur J Cancer* 2013; 49 (3): 658-667.
47. Righi V, Andronesi OC, Mintzopoulos D, Black PM, Tzika AA. High-resolution magic angle spinning magnetic resonance spectroscopy detects glycine as a biomarker in brain tumors. *Int J Oncol* 2010; 36 (2): 301-306.

48. Wright AJ, Fellows GA, Griffith JR, Wilson M, Bell BA, Howe FA. Ex-vivo HRMAS of adult brain tumours: metabolite quantification and assignment of tumour biomarkers. *Cancer* 2010; 9: 66.
49. García-Gómez JM, Luts J, Julià-Sapé M, Krooshof P, Tortajada S, Robledo JV, et al. Multiproject-multicenter evaluation of automatic brain tumor classification by magnetic resonance spectroscopy. *MAGMA* 2009; 22(1): 5-18.
50. Esteve V, Celda B, Martínez-Bisbal MC. Use of <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P HRMAS to evaluate the relationship between quantitative alterations in metabolite concentrations and tissue features in human brain tumour biopsies. *Anal Bioanal Chem* 2012; 403(9): 2611-2625.
51. Croitor A, Martinez-Bisbal MC, Van Huffel S, Cerda JM, Sima DM, Celda B. Ex vivo high resolution magic angle spinning metabolic profiles describe intratumoral histopathological tissue properties in adult human gliomas. *Magn Reson Med* 2011; 65(2): 320-328.
52. Martínez-Bisbal MC, Monleon D, Assemat O, Piotto M, Piquer J, Llácer JL, et al. Determination of metabolite concentrations in human brain tumour biopsy samples using HR-MAS and ERETIC measurements. *NMR Biomed* 2009; 22(2): 199-206.
53. Tugnoli V, Schenetti L, Mucci A, Parenti F, Cagnoli R, Righi V, et al. *Ex vivo* HR-MAS of human meningiomas: A comparison with *in vivo* <sup>1</sup>H MR spectra. *Int J Mol Med* 2006; 18: 859-869.
54. Pfisterer WK, Nieman RA, Sheck AC, Coons SW, Spetzler RF, Preul MC. Using ex vivo proton magnetic resonance spectroscopy to reveal associations between biochemical and biological features of meningiomas. *Neurosurg Focus* 2010; 28 (1): E12. doi 10.3171/2009.11.FOCUS09216.
55. Martinez-Bisbal MC, Esteve V, Monleon D, Martinez-Granados B, Piquer J, Revert AJ, et al. <sup>1</sup>H HR-MAS on brain tumour biopsies for the metabolical study of GBM, meningiomas and metastases. *MAGMA Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 2005; 18(S1): S167-S168.
56. Kirgis HD, Locke W. Anatomy and embriology. En: Locke W, Schally AV, editores. *The hypothalamus and pituitary in health and disease*. 1ª edición. Springfield. Charles C. Thomas. 1972. pp 3-65.
57. Amar AP, Weiss MH. Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am* 2013; 14 (1): 11-23.

58. Goodman HM. Pituitary gland. En: Johnson LR, editor. Essential medical physiology. 3ª edición. California. Elsevier. 2003. pp 573-587.
59. Allen MB. Embryology and anatomical connections of the pituitary. En: Allen MB, Mahesh VB, editores. The pituitary: a current review. 1ª edición. New York. Academic Press. 1977. pp 1-8.
60. White BA. The hypothalamus and pituitary gland. En Berne RM, Levy MN, editores. Physiology. Updated edition. 6ª edición. St Louis. Mosby. 2009. pp 706-724.
61. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr C, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. Cancer 2004; 101 (3): 613-619.
62. Nammour GM, Ybarra J, Nahhedy MH, Romeo JH, Aron DC. Incidental pituitary macroadenoma: a population-based study. Am J Med Sci 1997; 314 (5): 287-291.
63. Chambers EF, Turski PA, LaMasters D, Newton TH. Regions of low density in the contrast-enhanced pituitary gland: normal and pathologic processes. Radiology 1982; 144 (1): 109-113.
64. Yue NC, Longstreth WT Jr, Elster AD, Jungreis CA, O'Leary DH, Poirier VC. Clinically serious abnormalities found incidentally at MR imaging of the brain: data from the cardiovascular health study. Radiology 1997; 202 (1): 41-46.
65. Hall WA, Luciano MG, Doppman JL, Patronas NJ, Oldfield EH. Pituitary magnetic resonance imaging in normal human volunteers occult adenomas in the general population. Ann Intern Med 1994; 120 (10): 817-820.
66. Chong BW, Kucharczyk W, Singer W, George S. Pituitary gland MR: a comparative study of healthy volunteers and patients with microadenomas. AJNR Am J Neuroradiol 1994; 15 (4): 675-679.
67. Muhr C, Bergstrom K, Grimelius L, Larsson SG. A parallel study of the roentgen anatomy of the sella turcica and the histopathology of the pituitary gland in 205 autopsy specimens. Neuroradiology 1981; 21 (2): 55-65.
68. Teramoto A, Hirakawa K, Sanno N, Osamura Y. Incidental pituitary lesions in 1000 unselected autopsy specimens. Radiology 1994; 193 (1): 161-164.
69. Burrow GN, Wortzman G, Rewcastle NB, Holgate RC, Kovacs K. Microadenomas of the pituitary and abnormal sellar tomograms in an unselected autopsy series. N Engl J Med 1981; 304 (3): 156-158.

70. Costello RT. Subclinical adenoma of the pituitary gland. *Am J Pathol* 1936; 12 (2): 205-214.
71. Parent AD, Bebin J, Smith RR. Incidental pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1981; 54 (2): 228-231.
72. Siqueira MG, Guembarovski AL. Subclinical pituitary microadenomas. *Surg Neurol* 1984; 22 (2): 134-140.
73. Tomita T, Gates E. Pituitary adenomas and granular cell tumors: incidence, cell type and location of tumor in 100 pituitary glands at autopsy. *Am J Clin Pathol* 1999; 111 (6): 817-825.
74. McComb DJ, Ryan N, Horvath E, Kovacs K. Subclinical adenomas of the human pituitary: new light on old problems. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 107 (9): 488-491.
75. Laird NM, Mosteller F. Some statistical methods for combining experimental results. *Int J Technol Asses Health Care* 1990; 6: 5-30.
76. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7 (5): 257-266.
77. Sapochnik M, Nieto LE, Fuertes M, Arzt E. Molecular mechanisms underlying pituitary pathogenesis. *Biochem Genet* 2016; 54: 107-119.
78. Ezzat S. The role of hormones, growth factors and their receptors in pituitary tumorigenesis. *Brain Pathol* 2001; 11 (3): 356-370.
79. Xiaobing J, Xun Zhang. The molecular pathogenesis of pituitary adenomas: an update. *Endocrinol Metab* 2013; 28 (4): 245-254.
80. Daly AF, Vanbellinthen JF, Khoo SK, Jaffrain-Rea ML, et al. Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1891-1896.
81. Casanueva FF, Molitch ME, Schlechte JA, Abs R, Bonert V, Bronstein MD, et al. Guidelines of the pituitary society for the diagnosis and management of prolactinomas. *Clin Encocrinol (Oxf)* 2006; 65 (2): 265-273.
82. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, et al. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96 (2): 273-288.
83. Halperin I, Cámara R, García M, Ollero D. Guía clínica del diagnóstico y tratamiento del prolactinoma y la hiperprolactinemia. *Endocrinol Nutr* 2013; 60 (6): 308-319.

84. Colao A. Pituitary tumors: the prolactinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009 Oct; 23 (5): 575-596.
85. Saunders S, Vora JP. Endocrine evaluation of pituitary tumors. *Br J Neurosurg* 2008 Aug; 22 (4): 602-608.
86. Melmed S, Casanueva FF, Cavagnini F, Chanson P, Frohman L, Grossman A, et al. Guidelines for acromegaly treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 (9): 4054-4058.
87. Cordido F, García-Arnés JA, Marazuela M, Torres V. Guía práctica de diagnóstico y tratamiento de la acromegalia. *Endocrinol Nutr* 2013; 60 (8): 457.
88. Melmed S, Colao A, Barkan A, Molitch M, Grossman AB, Kleinberg D, et al. Guidelines for acromegaly management: an update. *Clin Endocrinol Metab* 2009; 94 (5): 1509-1517.
89. Biermasz N. Pituitary gland: New consensus in acromegaly: criteria for cure and control. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6 (9): 480-481.
90. Kutznelson L, Laws ER, Melmed S, Molitch E, Murad MH, Utz A, et al. Acromegaly: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99 (11): 3933-3951.
91. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (5): 1526-1540.
92. Biller BMK, Grossman AB, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J, et al. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (7): 2454-62.
93. Lamas C, Estrada J. Tratamiento de la enfermedad de Cushing. Cirugía transesfenoidal y radioterapia hipofisaria. *Endocrinol Nutr* 2009; 56 (3): 123-131.
94. Gilsanz A, Moreno B, Obiols G, Zugasti A, Catalá M, Lucas T, et al. Guía clínica del diagnóstico y tratamiento de los tumores hipofisarios no funcionantes y gonadotropinomas. *Endocrinol Nutr* 2006; 53 (1): 13-18.
95. Beck-Peccoz P, Persani L. Thyrotropinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008 Mar; 37 (1): 123-34.
96. Roelfsema F, Kok S, Kok P, Pereira AM, Biermasz NR, Smit JW, et al. Pituitary-hormone secretion by thyrotropinomas. *Pituitary* 2009; 12 (3): 200-210.
97. Greenman Y, Stern N. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23 (5): 625-638.

98. Jaffe C. Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary* 2009; 9 (4): 317-321.
99. Alameda C, Lahera M, Varela C. Tratamiento de los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes. *Endocrinol Nutr* 2010; 57 (2): 71-81.
100. Buchfelder M, Schlaffer SM. Modern imaging of pituitary adenomas. *Front Horm Res* 2010; 38: 109-20.
101. Chaudhary V, Bano S. Imaging of the pituitary: recent advances. *Ind J End Metab* 2011; 15 (Supp 3): 216-223.
102. Johnsen DE, Woodruff WW, Allen IS, Cera PJ, Funkhouser GR, Coleman LL. MR imaging of the sellar and juxtaseilar regions. *Radiographics* 1991; 11 (5): 727-758.
103. Fujisawa I, Asato R, Nishimura K, Togashi K, Ito K, Nakano Y, et al. Anterior and posterior lobes of pituitary gland: assesment by 1.5 MR imaging. *J Comput Assist Tomogr* 1987; 11 (2): 214-220.
104. Sato N, Ishizaka H, Yagi H, Matsumoto M, Endo K. Posterior lobe of the pituitary in diabetes insipidus: dinamic MR imaging. *Radiology* 1993; 186 (2): 357-360.
105. Bonneville JF. Magnetic resonance imaging of pituitary tumors. *Front Horm Res* 2016; 45: 97-120.
106. Morana G, Maghnie M, Rossi A. Pituitary tumors: advances in neuroimaging. *Endocr Dev* 2010; 17: 160-174.
107. Gao R, Isoda H, Tanaka T, Inagawa S, Takeda H, Takehara Y, et al. Dynamic gadolinium-enhanced MR imaging of pituitary adenomas: usefulness of sequential sagittal and coronal plane images. *Eur J Radiol* 2001; 39 (3): 139-146.
108. Majós C, Coll S, Aguilera C, Acebes JJ, Pons LC. Imaging of giant pituitary adenomas. *Neuroradiology* 1998; 40 (10): 651-655.
109. Chatzellis E, Alexandraki KI, Androulakis II, Katsas G. Aggressive pituitary tumors. *Neuroendocrinology* 2015; 101 (2): 87-104.
110. 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* 1993; 33 (4): 610-617.
111. Stadlbauer A, Buchfelder M, Nimsky C, Saeger W, Salomonowitz E, Pinker K, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy in pituitary macroadenomas: preliminary results. *J Neurosurg* 2008; 109 (2): 306-312.

112. Chernov MF, Kawamata T, Amano K, Ono Y, Suzuki T, Nakamura R, et al. Possible role of single-voxel (1)H-MRS in differential diagnosis of suprasellar tumors. *J Neurooncol*. 2009; 91(2): 191-198.
113. Sener RN. Proton MR spectroscopy of craniopharyngiomas. *Comput Med Imaging Graph* 2001; 25 (5): 417-422.
114. Jouibari FM, Ghodsi SM, Akhlaghpour S, Mehrazin M, Saadat S, Khoshnevisan A, et al. Complementary effect of H MRS in diagnosis of suprasellar tumors. *Clin Imaging* 2012; 36 (6): 810-815.
115. Saini KS, Patel AL, Shaikh WA, Magar LN, Pungaonkar SA. Magnetic resonance spectroscopy in pituitary tuberculoma. *Singapore Med J* 2007; 48 (8): 783-786.
116. Bailey P, Cushing H. Studies in acromegaly. VII. The microscopical structure of the adenomas in acromegalic dyspituitarism (fugitive acromegaly). *Am J Pathol* 1928; 4: 545-564.
117. Salassa RM, Kearns TP, Kernohan JW, Sprague RG, Maccarty CS. Pituitary tumors in patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1959; 19: 1523-1539.
118. Horvath E, Kovacs K. Ultrastructural classification of pituitary adenomas. *Can J Neurol Sci* 1976; 3: 9-21.
119. Kovacs K, Horvath E, Ezrin C. Pituitary adenomas. *Pathol Annu* 1977; 12: 341-382.
120. Scanarini M, Mingrino S. Functional classification of pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)* 1980; 52 (3.4): 195-202.
121. Kovacs K, Horvath E, Vidal S. Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol* 2001; 54: 21-127.
122. Labat-Moleur F, Trouillas J, Seret-Begue D, Kujas M, Delisle MB, Ronin C. Evaluation of 29 monoclonal and polyclonal antibodies used in the diagnosis of pituitary adenomas. A collaborative study from pathologists of the Club Français de l'Hypophyse. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 534-538.
123. Osamura RY. Immunoelectron microscopic studies of GH and  $\alpha$  subunit in GH secreting pituitary adenomas. *Pathol Res Pract* 1988; 183 (5): 569-571.
124. Beck-Peccoz P, Bassetti M, Spada A, Medri G, Arosio M, Giannattasio G, et al. Glycoprotein alpha-subunit response to growth hormone (GH)-releasing hormone in

- patients with active acromegaly. Evidence for alpha-subunit and GH coexistence in the same tumoral cell. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61 (3): 541-546.
125. Sanno N, Teramoto A, Osamura RY, Horvath E, Kovacs K, Lloyd RV, et al. Pathology of pituitary tumors. *Neurosurg Clin N Am* 2003; 14 (1): 25-39.
126. Neumann PE, Goldman JE, Horoupian DS, Hess MA. Fibrous bodies in growth hormone-secreting adenomas contain cytokeratin filaments. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109 (6): 505-508.
127. Beckers A, Courtoy R, Stevenaert A, Boniver J, Closset F, Frankenne F, et al. Mammosomatotropes in human pituitary adenomas as revealed by electron microscopic double gold immunostaining method. *Acta Endocrinol* 1988; 118: 503-512.
128. Horvath E, Kovacs K, Killinger DW, Smyth HS, Weiss MH, Ezrin C. Mammosomatotroph cell adenoma of the human pituitary: a morphologic entity. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1983; 398 (3): 277-289.
129. Kovacs K, Horvath E. Tumors of the pituitary gland. *Atlas of tumor pathology*. Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 1986, series 2, fasc 21, 16-50.
130. Lloyd RV, Cano M, Chandler WF, Barkan AL, Horvath E, Kovacs K. Human growth hormone and prolactin secreting pituitary adenomas analyzed by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1989; 134 (3): 605-613.
131. Horvath E, Kovacs K, Singer W, Smyth HS, Killinger DW, Ezrin C, et al. Acidophil stem cell adenoma of the human pituitary: clinico-pathological analysis of 15 cases. *Cancer* 1981; 47 (4): 761-771.
132. Horvath E, Kovacs K. The adenohypophysis. En: Kovacs K, Asa SL, editores. *Functional endocrine pathology*. 1ª edición. Boston. Blackwell Scientific. 1991. pp 245-281.
133. Li J, Stefanescu L, Kovacs K, Horvath E, Smyth HS. Growth hormone (GH) and prolactin (PRL) gene expression and immunoreactivity in GH- and PRL-producing human pituitary adenomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 422 (3): 193-201.
134. von Westarp C, Weir BK, Shnitka TK. Characterization of a pituitary stone. *Am J Med* 1980; 68 (6): 949-954.
135. Saeger W, Horvath E, Kovacs K. Prolactin producing adenomas. En: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editores. *World Health Organization*

- Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon. IARC Press. 2004. pp 20-23.
136. Horvath E. Ultrastructural markers in the pathological diagnosis of pituitary adenomas. *Ultrastruct Pathol* 1994; 18 (1-2): 171-179.
  137. Horvath E, Kovacs K. Misplaced exocytosis. Distinct ultrastructural feature in some pituitary adenomas. *Arch Pathol* 1974; 97 (4): 221-224.
  138. Asa SL. Tumors of the pituitary gland, ed 3. Washington. Armed Forces Institute of Pathology, 1998.
  139. Beck-Peccoz P, Piscitelli G, Amr S, Ballabio M, Basetti G, Giannattasio, et al. Endocrine, biochemical and morphological studies of a pituitary adenoma secreting growth hormone, thyrotropin (TSH) and  $\alpha$ -subunit: evidence for secretion of TSH with increased bioactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 704-711.
  140. Sanno N, Teramoto A, Matsuno A, Takekoshi S, Osamura RY. GH and PRL gene expression by non-radioisotopic in situ hybridization in TSH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2518-2522.
  141. Trouillas J, Barkan AL, Watson RE Jr. ACTH producing adenomas. En: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editores. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon. IARC Press. 2004. pp 24-25.
  142. Horvath E, Kovacs K, Killinger DW, Smyth HS, Platts ME, Singer W. Silent corticotrophic adenomas of the human pituitary gland: a histologic, immunocytologic and ultrastructural study. *Am J Pathol* 1980; 98 (3): 617-638.
  143. McNicol AM. Patterns of corticotrophic cells in the adult human pituitary in Cushing's disease. *Diagn Histopathol* 1981; 4 (4): 335-341.
  144. Charpin C, Hassoun J, Oliver C, Jaquet P, Argemi B, Grisoli F, et al. Immunohistochemical and immunoelectron-microscopic study of pituitary adenomas associated with Cushing's disease. A report of 113 cases. *Am J Pathol* 1982; 109 (1): 1-7.
  145. Neumann PE, Horoupian DS, Goldman JE, Hess MA. Cytoplasmic filaments of Crooke's hyaline change belongs to the cytokeratin class. An immunohistochemical and and ultrastructural study. *Am J Pathol* 1984; 116 (2): 214-222.
  146. Felix IA, Horvath E, Kovacs K. Massive Crooke's hyalinization in corticotroph cell adenomas of the human pituitary. A histological, immunocytological and

- electron microscopic study of three cases. *Acta Neurochir (Wien)* 1981; 58 (3): 235-243.
147. Asa SL, Ezzat S, Watson RE Jr. Gonadotropin producing adenomas. En: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editores. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs.* Lyon. IARC Press. 2004. pp 30-32.
148. Snyder PJ. Gonadotroph cell adenomas of the pituitary. *Endocr Rev* 1985; 6 (4): 552-563.
149. Horvath E, Kovacs E. Gonadotroph adenomas of the human pituitary: sex-related fine structural dichotomy. A histologic, immunocytochemical and electron microscopic study of 30 tumors. *Am J Pathol* 1984; 117 (3): 429-440.
150. Sano T, Yamada S, Watson RE Jr. Null cell adenomas. En: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editores. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs.* Lyon. IARC Press. 2004. pp 20-23.
151. Kovacs k, Horvath E, Ryan N, Ezrin C. Null cell adenoma of the human pituitary. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1980; 387 (2): 165-174.
152. Landolt AM, Oswald UW. Histology and ultrastructure of an oncocytic adenoma of the human pituitary. *Cancer* 1973; 31 (5): 1099-1105.
153. Horvath E, Lloyd RV, Kovacs K. Plurihormonal adenoma. En: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editores. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs.* Lyon. IARC Press. 2004. pp 20-23.
154. Lloyd RV, Kovacs K, Young WF Jr. Pituitary tumors: introduction. En: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, editores. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs.* Lyon. IARC Press. 2004. pp 10-13.
155. Taphar K, Scheithauer BW, Kovacs K, Pernicone PJ, Laws ER Jr. p53 expression in pituitary adenomas and carcinomas: correlation with invasiveness and tumor growth fractions. *Neurosurgery* 1996; 38 (4): 765-771.
156. Vidal S, Kovacs K, Horvath E, Scheithauer BW, Kuroki T, Lloyd RV. Microvessel density in pituitary adenomas and carcinomas. *Virchows Arch* 2001; 438 (6): 595-602.

157. Jane JA Jr, Laws ER Jr. Surgical treatment of pituitary adenomas. [Updated 2013 May 1]. En: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershmann JM, et al. Endotext [Internet]. South Darmouth (MA): MDText.com, Inc; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278983/>
158. Mortini P, Losa M, Barzaghi R, Boari N, Giovanelli M. Results of transsphenoidal surgery in a large series of patients with pituitary adenoma. *Neurosurgery* 2005; 56 (6): 1222- 1233.
159. Ciric I, Ragin A, Baumgartner C, Pierce D. Complications of transsphenoidal surgery: results of a national survey, review of the literature and personal experience. *Neurosurgery* 1997; 40 (2): 225-236.
160. Di Ieva , Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas: diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10 (7): 423-435.
161. Pashtan I, Oh KS, Loeffler JS. Radiation therapy in the management of pituitary adenomas. *Handb Clin Neurol* 2014; 124: 317-324.
162. Minniti G, Clarke E, Scarigni C, Enrici RM. Stereotactic radiotherapy and radiosurgery for non-functioning and secreting pituitary adenomas. *Rep Pract Oncol Radiother* 2016; 21 (4): 370-378.
163. Rim CH, Yaeng DS, Park YJ, Yoon WS, Lee JA, Kim CY. Radiotherapy for pituitary adenomas: long-term outcome and complications. *Radiation Oncol J* 2011; 29 (3): 156-163.
164. Loeffler JS, Shih HA. Radiation therapy of pituitary adenomas. In: UpToDate, Snyder PJ (Ed), UpToDate, Waltham, MA. (Accessed on December 06, 2016).
165. Trygg J, Holmes E, Lundstedt J. Chemometrics in metabolomics. *J Proteome Res* 2007; 6 (2): 469-79.
166. Hardy J, Grisoli F, Leclercq TA, Somma M. Transphenoidal hypophysectomy in metastasizing breast cancers. Experience from 10 cases. *Nouv Press Med* 1975; 4 (33): 2387-2390.
167. Sitter B, Lungren S, Bathen TF, Halgunset J, Fjosne HE, Gribbestad IS. Comparison of HR MAS MR spectroscopic profiles of breast cancer with clinical parameters. *NMR Biomed* 2006; 19: 30-40.
168. Worley B, Powers R. Multivariate analysis in metabolomics. *Cur Metabolomics* 2013; 1 (1): 92-107.

169. Ackerstaff E, Glunde K, Bhujwala ZM. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells. *J Cell Biochem* 2013; 90: 525-533.
170. Gribbestad IS, Sitter B, Lundgren S, Krane J, Axelson D. Metabolite Composition in breast tumors examined by protonnuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anticancer Res.* 1999; 19: 1737–1746.
171. Natarajan K, Mori N, Artemov D, Aboagye EO, Chacko VP, Bhujwala ZM. Phospholipid profiles of invasive human breastcancer cells are altered towards a less invasive phospholipidprofile by the anti-inflammatory agent indomethacin. *Adv. EnzymeRegul* 2000; 40: 271–284.
172. Del Basso De Caro M, Solari D, Pagliuca F, Villa A, Guadagno E, Cavallo LM., et al. Atypical pituitary adenomas: clinical characteristics and role of ki-67 and p53 in prognostic and therapeutic evaluation. A series of 50 patients. *Neurosurgery Rev.* Mai 2016. doi 10.1007/s10143-016-0740-9.
173. Croitor A, Sima DM, Martínez-Bisbal MC, Celda B, Van Huffel S. Non-negative blind source separation techniques for tumor tissue using HR-MAS signals. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2010; 2010: 3658-61. Doi: 10,1109/IEMBS.2010.5627436.
174. Martínez-Bisbal MC, Martínez-Granados B, Rovira V, Celda B, Esteve V. Magnetic resonance spectroscopy and imaging of fresh human brain tumor biopsies at microscopic resolution. *Anal Bioanal Chem* 2015 Sep; 407 (22): 6771-80.
175. Martínez-Bisbal MC, Celda B, Martí-Bonmatí L, Ferrer P, Revert AJ, Piquer J, et al. Contribución de espectroscopia de resonancia magnética a la clasificación del glioma de alto grado. Valor predictivo de las macromoléculas. *Rev neurol* 2002; 34: 309-13.
176. Luque RM, Ibáñez-Costa A, Sánchez-Tejada L, Rivero-Cortés E, Robledo M, Madrazo-Atutxa A, 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* 2016; 63 (6): 274-84.
177. Calligaris D, Feldman DR, Norton I, Olubiyi O, Changelian AN, Machaidze R, et al: MALDI mass spectrometry imaging analysis of pituitary adenomas for near-real-time tumor delineation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Aug 11; 112(32): 9978–9983.
178. Kovacs K. Light and electron microscopic pathology of pituitary tumors: immunohistochemistry. In Black PMcL, editor. *Secretory tumors of the pituitary*

gland. Progress in endocrine research and therapy, vol 1. New York: Raven Press; 1984. P. 365-376.