



ORIGINAL

El Registro Molecular de Adenomas Hipofisarios (REMAH): una apuesta de futuro de la Endocrinología española por la medicina individualizada y la investigación traslacional



Raúl M. Luque^{a,1}, Alejandro Ibáñez-Costa^{a,1}, Laura Sánchez-Tejada^b, Esther Rivero-Cortés^a, Mercedes Robledo^c, Ainara Madrazo-Atutxa^d, Mireia Mora^e, Clara V. Álvarez^f, Tomás Lucas-Morante^g, Cristina Álvarez-Escolá^h, Carmen Fajardoⁱ, Luis Castaño^j, Sonia Gaztambide^k, Eva Venegas-Moreno^d, Alfonso Soto-Moreno^d, María Ángeles Gálvez^l, Javier Salvador^m, Elena Valassiⁿ, Susan M. Webb^{n,o}, Antonio Picó^b, Manel Puig-Domingo^p, Montserrat Gilabert^q, Ignacio Bernabéu^r, Mónica Marazuela^s, Alfonso Leal-Cerro^{t,2}, Justo P. Castaño^{a,*,2} e investigadores del REMAH³

^a Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC); Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba; Hospital Universitario Reina Sofía; Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3); CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Córdoba, España

^b Departamento de Endocrinología, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España

^c Grupo de Cáncer Endocrino Hereditario, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, España

^d Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

^e Unidad de Endocrinología, Hospital Clinic i Universitari de Barcelona, Barcelona, España

^f Grupo de Neoplasia y Diferenciación Endocrina, Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Instituto de Investigaciones Sanitarias; Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España

^g Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid, España

^h Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

ⁱ Servicio de Endocrinología, Hospital Universitario de La Ribera, Alzira, España

^j Grupo de Investigación de Endocrinología y Diabetes, Hospital Universitario de Cruces, Barakaldo, España

^k Departamento de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario de Cruces, Barakaldo, España

^l Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Reina Sofía; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Córdoba, España

^m Departamento de Endocrinología y Nutrición, Clínica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra; Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, España

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: aleal@neuroendocrinologia.net (A. Leal-Cerro), justo@uco.es (J.P. Castaño).

¹ Estos dos autores han contribuido de igual manera a este estudio y se consideran coprimeros autores.

² Estos dos autores han contribuido de igual manera a este estudio y se consideran coautores sénior.

³ Puede consultar un listado de participantes en el anexo A.

ⁿ Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBER-ER, Unidad 747), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, España

^o Servicio de Endocrinología, Departamento de Medicina, Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^p Departamento de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol; Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Raras (CIBER-ER), Badalona, España

^q Departamento Médico, Novartis Farmacéutica, Barcelona, España

^r Servicio de Endocrinología y Nutrición, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, España

^s Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, España

^t Laboratorio de Endocrinología, IBI-S, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

Recibido el 6 de octubre de 2015; aceptado el 7 de marzo de 2016
 Disponible en Internet el 16 de abril de 2016

PALABRAS CLAVE

Adenoma hipofisario;
 Tumor;
 Acromegalia;
 Cushing;
 Estudio multicéntrico

Resumen Los adenomas hipofisarios son tumores infrecuentes de diagnóstico complejo, cuya heterogeneidad y baja incidencia dificultan estudios a gran escala. El Registro Molecular de Adenomas Hipofisarios (REMAH) nació en 2008 en el seno de la Sociedad Andaluza de Endocrinología y Nutrición (SAEN), como estrategia de cooperación clínico-básica y multicéntrica, para mejorar el diagnóstico y tratamiento de tumores hipofisarios mediante la combinación de información clínica, anatomopatológica y molecular. En 2010, la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN) lo extendió a nivel nacional, estableciendo 6 nodos con protocolos y métodos comunes de recogida de muestras y datos clínicos, análisis molecular y anotación en un mismo registro (www.remahnacional.com). El registro combina datos clínicos con el fenotipado molecular del adenoma intervenido, mediante PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión de 26 genes: hormonas hipofisarias (GH-PRL-LH-FSH-PRL-ACTH-CGA), receptores (somatostatina, dopamina, GHRH, GnRH, CRH, arginina-vasopresina, ghrelina), otros marcadores (Ki67, PTTG1) y genes de control. Hasta 2015 se ha obtenido información molecular de 704 adenomas, de los 1.179 pacientes registrados. Esta estrategia permite abordar análisis comparativos y relacionales entre el perfil molecular de los distintos tipos de adenomas y el fenotipo clínico del paciente, lo que puede ofrecer un mejor conocimiento de la enfermedad y, potencialmente, ayudar en la selección del tratamiento. El REMAH constituye una red única, multicéntrica e interdisciplinar, cimentada en una base de datos compartida, que aporta un enfoque traslacional de gran proyección potencial para el manejo de los adenomas hipofisarios y abre el camino para estudios conjuntos clínico-básicos innovadores con un elevado número de pacientes.

© 2016 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Pituitary adenoma;
 Tumor;
 Acromegaly;
 Cushing;
 Multicenter study

The Molecular Registry of Pituitary Adenomas (REMAH): A bet of Spanish Endocrinology for the future of individualized medicine and translational research

Abstract Pituitary adenomas are uncommon, difficult to diagnose tumors whose heterogeneity and low incidence complicate large-scale studies. The Molecular Registry of Pituitary Adenomas (REMAH) was promoted by the Andalusian Society of Endocrinology and Nutrition (SAEN) in 2008 as a cooperative clinical-basic multicenter strategy aimed at improving diagnosis and treatment of pituitary adenomas by combining clinical, pathological, and molecular information. In 2010, the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition (SEEN) extended this project to national level and established 6 nodes with common protocols and methods for sample and clinical data collection, molecular analysis, and data recording in a common registry (www.remahnacional.com). The registry combines clinical data with molecular phenotyping of the resected pituitary adenoma using quantitative real-time PCR of expression of 26 genes: Pituitary hormones (GH-PRL-LH-FSH-PRL-ACTH-CGA), receptors (somatostatin, dopamine, GHRH, GnRH, CRH, arginine-vasopressin, ghrelin), other markers (Ki67, PTTG1), and control genes. Until 2015, molecular information has been collected from 704 adenomas, out of 1179 patients

registered. This strategy allows for comparative and relational analysis between the molecular profile of the different types of adenoma and the clinical phenotype of patients, which may provide a better understanding of the condition and potentially help in treatment selection. The REMAH is therefore a unique multicenter, interdisciplinary network founded on a shared database that provides a far-reaching translational approach for management of pituitary adenomas, and paves the way for the conduct of combined clinical-basic innovative studies on large patient samples.

© 2016 SEEN. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Los tumores hipofisarios representan para la Medicina actual un reto complejo y relevante, cuyo abordaje requiere una aproximación conjunta e integrada, coordinadas desde la Endocrinología, Neurocirugía, Anatomía Patológica, Radiología y otras disciplinas de apoyo. En este contexto, la información generada en las últimas décadas por la Biología Celular y Molecular sobre los adenomas hipofisarios está ofreciendo un aporte sustancial para avanzar en el conocimiento de este conjunto de enfermedades y en el diseño de nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico, así como de nuevas dianas y estrategias terapéuticas. Sin embargo, existe aún una brecha importante entre los estudios moleculares de investigación básica y el manejo clínico de los pacientes con tumores hipofisarios, que dificulta una repercusión más rápida y efectiva de los descubrimientos científicos sobre la salud del paciente. Con objeto de acortar esta distancia, se ha generado una iniciativa de colaboración clínico-básica en el estudio de tumores hipofisarios, cuyo punto de partida es la creación de un registro de tumores que incluye, junto con los datos clínicos de los pacientes, el análisis molecular de la pieza del tumor hipofisario obtenido tras la intervención, en el que se evalúan los niveles de expresión de un conjunto de genes seleccionados por su potencial valor diagnóstico y por la posible utilidad clínica de la información que proporcionan. En este artículo se describen las líneas generales que han permitido generar esta iniciativa, denominada Registro Molecular de Adenomas Hipofisarios (REMAH), así como las principales características del fenotipado molecular.

Actualmente se acepta que los adenomas hipofisarios se generan por expansión clonal de un tipo concreto de célula adenohipofisaria¹⁻³; los síndromes clínicos resultantes derivan de la producción de una o varias hormonas, o bien son consecuencia de su crecimiento local^{4,5}. Así, entre los principales tipos de adenomas hipofisarios se incluyen los somatotropinomas, productores de hormona del crecimiento (GH)⁶, prolactinomas, productores de prolactina (PRL)⁷, corticotropinomas productores de adrenocorticotropina (ACTH)⁸, tirotropinomas, productores de tirotropina (TSH)⁹, gonadotropinomas, productores de hormona luteinizante (LH) u hormona foliculoestimulante (FSH)¹⁰ y los adenomas hipofisarios no funcionantes¹¹, derivados mayoritariamente del linaje gonadotropo, productores de subunidad alfa de las glicoproteínas (CGA).

A primera vista, la clasificación de los adenomas hipofisarios parece relativamente simple y genérica, lo que podría

indicar que el diagnóstico de estos tumores es sencillo; sin embargo, no es así. De hecho, con frecuencia aparecen células hipofisarias con secreción mixta de 2 o más hormonas, o distintas poblaciones celulares, que provocan síndromes combinados^{6,7,9-13}. Además, pueden presentarse adenomas silentes (distintos de los no funcionantes mencionados anteriormente), con poca o nula expresión hormonal, y otros con funcionalidad cíclica, todos ellos de muy difícil detección, por lo que resulta inestimable disponer de un detallado análisis anatomopatológico para un mejor diagnóstico de estas enfermedades^{14,15}. Todo ello, a su vez, subraya la necesidad de mejorar las herramientas disponibles actualmente para mejorar el diagnóstico y fenotipado clínico de los adenomas hipofisarios.

La secreción hormonal de las células hipofisarias y muchas de sus funciones tróficas (supervivencia, proliferación y mantenimiento de patrones específicos de expresión génica) están reguladas de forma primaria por hormonas hipotalámicas hipofisiotrópicas, un conjunto de péptidos neuroendocrinos de naturaleza estimuladora, como GHRH, GnRH, CRH y TRH, o bien inhibidora, como la somatostatina. Existen además reguladores hipotalámicos primarios no peptídicos, como el potente inhibidor dopamina^{4,5,16-18}. Todas estas hormonas actúan sobre sus células diana a través de receptores de membrana específicos, modulando rutas de transducción de la señal y proteínas de la ruta secretora. Aunque la presencia de estos receptores está alterada en muchos adenomas^{4,5,16-21}, la mayoría de los tumores expresan en mayor o menor medida receptores de las hormonas inhibidoras somatostatina y dopamina, que han servido como diana para el uso de fármacos en el tratamiento de varias enfermedades hipofisarias^{19,22-24}.

Junto con los reguladores primarios mencionados, existen otros factores con capacidad para regular la función hipofisaria, como la ghrelina, cuyo receptor, GHSR1a, se expresa abundantemente en la hipófisis²⁵⁻²⁹. El papel de AVP y sus receptores (AVPR1a, AVPR1b y AVPR2) a nivel hipofisario es clave para el mantenimiento de la homeostasis basal y en respuesta al estrés³⁰; de hecho, recientes estudios han demostrado el valor clave de AVPR1b en la enfermedad de Cushing^{31,32}. La securina (PTTG1) participa en la transformación celular de hiperplasia a adenoma, y su presencia se relaciona con angiogénesis^{33,34}; el biomarcador Ki67, se ha empleado como marcador inmunohistoquímico de proliferación celular, si bien su uso y utilidad real son aún controvertidos^{33,34}. Profundizar en el conocimiento de este conjunto de moléculas y sus alteraciones en adenomas hipofisarios puede ayudar a entender mejor la enfermedad y a

tomar decisiones más adecuadas con respecto a su tratamiento y seguimiento. Asimismo, la identificación en estos tumores de nuevas moléculas reguladoras permitiría ensayar su efecto y el de nuevos análogos en dichos tumores, e incrementar así el espectro de adenomas que pueden ser tratados farmacológicamente.

A la luz de la heterogeneidad de los tumores hipofisarios y de la importancia de conocer su perfil molecular, en 2008 se inicia el proyecto REMAH en el seno del grupo trabajo de Neuroendocrinología de la Sociedad Andaluza de Endocrinología y Nutrición (SAEN), concebido y desarrollado entre investigadores básicos y clínicos, con el objetivo de generar una información y un servicio útil para el endocrinólogo y su equipo neuroendocrino en el manejo de pacientes con tumores hipofisarios. En 2010, este proyecto suscitó el interés del grupo de trabajo de Neuroendocrinología de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN), que decidió apoyar y hacer suyo el proyecto desde su Fundación (FSEEN) y con el respaldo del patrocinio de Novartis. De este modo, el REMAH tomó un alcance nacional y se organizó en 6 nodos, coordinado cada uno de ellos por un investigador básico con experiencia molecular y un investigador clínico con experiencia en la atención de pacientes con enfermedad hipofisaria neuroquirúrgica. A cada nodo se adscriben los investigadores responsables de la atención y seguimiento de los pacientes, así como los investigadores responsables del fenotipado molecular. La distribución de los nodos es la siguiente: Andalucía (Córdoba), Comunidad de Madrid (Madrid), Comunidad Valenciana (Alicante), Galicia (Santiago de Compostela), Cataluña (Barcelona) y País Vasco (Bilbao). El estudio molecular que se realiza en cada nodo comprende los mismos 26 genes, cuyos niveles de expresión son analizados mediante un método sistematizado y estandarizado de registro y medida. La medida de la expresión génica aporta un mejor conocimiento de la enfermedad a nivel molecular y una posible ayuda para mejorar la decisión terapéutica. Además, como objetivo complementario, el proyecto REMAH plantea recoger los resultados moleculares de cada tumor hipofisario, junto con los datos clínicos del paciente, en un registro común, que proporcionará a todos los investigadores participantes una plataforma de investigación con una casuística importante de una enfermedad de baja prevalencia, todo lo cual puede ayudar a que la Neuroendocrinología española mejore su nivel de competitividad científica internacional.

Desde una perspectiva científica, el objetivo general del REMAH consiste en determinar la expresión en tumores hipofisarios de diferentes genes correspondientes a receptores, hormonas y otras proteínas reguladoras para su mejor diagnóstico. Ello permite el fin adicional de estudiar la relación de dichos parámetros con las características clínico-patológicas de los pacientes y analizar así su posible papel en el desarrollo y respuesta patológica de los adenomas hipofisarios. En concreto, el análisis de proteínas relacionadas en el control de la secreción hormonal, supervivencia o apoptosis celular que puedan afectar estas condiciones, hace concebible que se pueda establecer el valor potencial y la relevancia de las moléculas y señales analizadas como dianas de tratamiento, así como obtener unos marcadores tempranos de diagnóstico de estas enfermedades. De esta forma, se pretende poner en valor dichos datos para los investigadores clínicos y básicos implicados en el estudio.

Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos: 1) Evaluar la expresión de las hormonas hipofisarias y de los principales receptores de hormonas hipotalámicas, dando prioridad a los relativos a la enfermedad evaluada: somatostatina (sst1, sst2, sst3 y sst5), dopamina (DRD1, DRD2, DRD2L, DRD4 y DRD5), GHRH (GHRH-R), CRH (CRH-R1), AVP (AVPR1b) y ghrelina (GHSR1a). 2) Estudiar la expresión de otras proteínas reguladoras de la secreción o de la proliferación y muerte celular, que pueden ser usadas como marcadores o como nuevas dianas de tratamiento, PTTG1 y Ki67. 3) Determinar la posible relación entre los niveles de expresión de estos receptores y moléculas de interés con la respuesta de los pacientes a tratamientos farmacológicos específicos para los diferentes tipos de tumores hipofisarios, y con las características clínicas y la evolución de dichos pacientes. En concreto, el objetivo de la presente publicación es detallar el funcionamiento general del REMAH, su metodología y la muestra tumoral recogida hasta la fecha.

Materiales y métodos

Reclutamiento de pacientes. Consentimiento informado

El estudio REMAH se lleva a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y cuenta con la aprobación de los comités de ética de los hospitales participantes. Previamente a la inclusión de cada paciente, el investigador ha obtenido su consentimiento informado.

La metodología y diseño del estudio REMAH consta de 4 fases:

Preparación del caso

Diagnóstico. Se han tenido en cuenta los siguientes factores:

- Identificación funcional del tumor y de sus características clínicas específicas.
- Evaluación del tipo de respuesta a estímulos, potenciadores o supresores de la secreción hormonal en tumores funcionales.
- Identificación de secuelas del tumor relativas al resto de la estructura hipotálamo-hipofisaria.
- Evaluación de la respuesta farmacológica preoperatoria (análogos de somatostatina, inhibidores de la esteroidogénesis adrenal, etc.), tipo de fármaco, duración y efecto en la secreción hormonal (si es aplicable).
- Terapia de sustitución de déficits asociados previamente al tratamiento quirúrgico.
- Evaluación de la necesidad del uso de terapia con esteroides durante la cirugía.
- Toma de una muestra de sangre antes del tratamiento farmacológico o quirúrgico.

Tratamiento quirúrgico.

- Decisión y programación de los procedimientos quirúrgicos.
- Admisión hospitalaria.

- Recogida de datos de la historia clínica, siguiendo la hoja de datos que acompaña al protocolo REMAH, que se incluye en la correspondiente base de datos. En concreto se recogen los niveles, medidos en sangre circulante en ayunas, de: glucosa (mg/dL), HbA1c (%), colesterol (mg/dL), LDL (mg/dL), HDL (mg/dL), GH basal (ng/mL), PRL (mU/ml), ACTH (pg/ml), LH (mU/ml), FSH (mU/ml), TSH (μ U/ml), CGA (mU/mL), IGF-I (ng/mL), T4 libre (ng/l) y cortisol (μ g/dL). Informe tras cirugía: curación tras la intervención y control farmacológico en caso de no haber curación. Datos de imagen: tamaño de adenoma (<1 cm, microadenoma o >1 cm, macroadenoma), extensión extraselar, supraselar e infraselar, características en secuencias T1 y T2 de la RNM.
- Cabe mencionar que el registro permite, y tiene entre sus objetivos de futuro, desarrollar un seguimiento detallado del paciente después del tratamiento quirúrgico o bajo tratamiento médico, incluyendo la recogida de muestras de sangre a los 6 y 12 meses.

Toma de muestra de adenoma hipofisario

La toma de muestras se organiza según un procedimiento estandarizado. Cada centro participante aplica un sistema de coordinación propio que asegura una recogida adecuada de muestras de todos los tumores intervenidos en dicho centro, según los requisitos del procedimiento acordado. La coordinación y supervisión de los procedimientos depende de los investigadores responsables tanto de la recogida de muestras como de los datos clínicos correspondientes.

1. La pieza quirúrgica se trata como una muestra «intraoperatoria» para Anatomía Patológica, evitando cualquier tipo de retraso en la recogida. En el quirófano de neurocirugía, la muestra del adenoma se pondrá inmediatamente en suero fisiológico frío, nunca en formol, y sin que pasen más de 30 min desde su extracción hasta su procesamiento.
2. La pieza debe valorarse en el Servicio de Anatomía Patológica, que proporciona, tras reservar la porción necesaria para su diagnóstico, un fragmento representativo, que es transferido a un criotubo con solución estabilizadora RNAlater (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.); si el fragmento es mayor de 0,5 cm, debe dividirse para que penetre la sustancia estabilizadora. El criotubo es identificado con un código REMAH, generado en la aplicación/registro informático, que será vinculado al código correspondiente de la historia clínica del paciente y al informe del Servicio de Endocrinología. El criotubo con la muestra se almacena a 4 °C hasta su traslado al nodo de referencia seleccionado.
3. Envío de la muestra de adenoma al nodo de referencia. El transporte de la muestra tumoral se realiza en el propio criotubo, bien en frío o a temperatura ambiente.

Estudio de la muestra tumoral

Variables de estudio

Se detallan a continuación los parámetros analizados a lo largo del desarrollo del proyecto global:

- Datos demográficos: sexo y edad.
- Niveles de expresión molecular, medidos por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR): GH, PRL, POMC, subunidades β de las hormonas luteinizante, folículo estimulante y estimulante del tiroides (LHB, FSHB y TSHB, respectivamente), subunidad α de las glicoproteínas (CGA), sst1, sst2, sst3, sst5, DRD1, DRD2T, DRD2L, DRD4, DRD5, GnRH-R, GHRH-R, CRH-R1, GHSR1a, AVPR1b, Ki67, PTTG1, y los genes de control de la β actina (ACTB), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT).
- Niveles bioquímicos en sangre, informe tras cirugía y datos de imagen indicados.

Estudio molecular: extracción de ARN y transcripción inversa

Los fragmentos de tejido tumoral se procesan de forma estandarizada y protocolizada para la evaluación de la expresión génica. Dependiendo del tipo de tumor, de las características de la enfermedad estudiada y del tamaño de la muestra disponible, se realiza una priorización de los genes que serán analizados, con atención preferente a las necesidades de información clínica de la dolencia. La extracción de ARN de la muestra se realiza, como se ha descrito previamente²⁹, utilizando AllPrep RNA/DNA/Prot suplementado con RNase-Free DNase Set (#80004 y #79254, respectivamente, Qiagen, Limburg, Países Bajos) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pieza tumoral se homogeneiza en frío usando *buffer* RLT suplementado con beta-mercapto-etanol, utilizando un vástago accionado por una pistola eléctrica (#749515-0000 y #749540-0000, respectivamente, Kontes, Sigma-Aldrich, Madrid, España), tras lo cual se realiza el aislamiento de ARN por el sistema de columnas incluido en el kit. Seguidamente, se eluye el ARN en 30-50 μ L de agua DEPC, dependiendo del tamaño de la muestra. La transcripción inversa del ARN se lleva a cabo utilizando RevertAid FirstStrand cDNA synthesis kit (#K1622, Fermentas, Hanover, MD, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante, usando hexámeros aleatorios. En concreto, se ha considerado como óptima la utilización de 0,5 μ g de ARN por reacción, con una reacción doble (1 μ g de ARN) para obtener un volumen final de 40 μ L de ADN copia, que se guarda a -20 °C hasta la medida por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Selección de cebadores (*primers*)

Todas las parejas de cebadores se han diseñado utilizando las secuencias genómicas de GenBank (National Center for Biotechnology Information) y el programa Primer3^{35,36}, como se ha descrito anteriormente¹⁷, utilizando los siguientes criterios: a) la diferencia en la temperatura de unión entre ambos cebadores no es mayor de 0,2 °C, b) se han excluido los cebadores que generan dímeros de cebadores y 3) amplifican un producto entre 100 y 200 pares de bases. Las secuencias de los cebadores fueron comprobadas mediante BLAST (National Center for Biotechnology Information) para evitar la potencial homología con otras secuencias. La secuencia de los cebadores, los tamaños esperados y los números de GenBank se muestran en la [tabla 1](#).

Tabla 1 Secuencia de los *primers*, tamaños esperados y números de GenBank para los genes de estudio

Gen	N.º de GenBank	Secuencia		Tamaño		
		Sentido (pb)	Antisentido (pb)			
ACTB	NM_001101	ACTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	21	CAGTGATCTCCTTCTGCATCCT	22	176
GAPDH	NM_002046	AATCCCATCACCATCTTCCA	20	AAATGAGCCCCAGCCTTC	18	122
HPRT	BT019350	CTGAGGATTTGGAAAGGGTGT	21	TAATCCAGCAGGTCAGCAAAG	21	157
GH	NM_000515	GACCTAGAGGAAGGCATCCAAA	22	AGCAGCCCGTAGTTCTTGAGTAG	23	143
PRL	BC015850	CCTTCGAGACCTGTTTGACC	20	ATCTGTTGGGCTTGCTCCTT	20	183
POMC	BC065832	CCCTACAGGATGGAGCACTT	20	CGTTCTTGATGATGGCGTTT	20	127
LHB	NM_000894	GCCTCCTCTTCTCTAAAGACC	22	GCGGATTGAGAAGCCTTTATT	21	104
FSHB	NM_000510	TTGGTGTGCTGGCTACTGCT	20	GGGCACTCTCACTGTTTCGT	20	115
TSHB	NM_000549.3	ATTGCCTAACCATCAACACCAC	22	AAACATCCTGGGACAGAGCATA	22	102
CGA	NM_000735.2	GCAAAAAGCCAGAGAAAGG	20	ATCAGGAGCGGAATGGAGAA	20	107
sst1	NM_001049	CACATTTCTCATGGGCTTCCT	21	ACAAACACCATCACCACCATC	21	165
sst2	NM_001050	GGCATGTTTGACTTTGTGGTG	22	GTCTCATTGAGCCGGGATTT	20	185
sst3	NM_001051	TGCCTTCTTTGGGCTCTACTT	22	ATCCTCCTCCTCAGTCTTCTCC	22	190
sst5	NM_001053	CTGGTGTGTTGCGGGATGTT	19	GAAGCTCTGGCGGAAGTTGT	20	183
DRD1	AF498961	GACCACCACAGGTAATGGAAAG	22	AAGAAAGGTAGCCAACAGCACA	22	141
DRD2T	NM_016574	CGAGCATCCTGAACCTGTGTG	21	GCGTTATTGAGTCCGAAGAGG	21	172
DRD2L	NM_000795	CTCCTCCATCGTCTCCTTCT	20	CGGTGCAGAGTTTCATGTCC	20	188
DRD4	L12398	GACGCCCTTCTTCGTGGT	18	GACAGTGTAGATGACGGGGTTG	22	130
DRD5	AY136750	CTGGGCTAACTCCTCACTCAAC	22	ATTGCTGATGTTCCACCTCTC	21	130
GnRH-R	AY392011.1	TGCCTCTTTCATCCTCTCTT	21	AGTCTTCAGCCGTGCTCTTG	20	144
GHRH-R	NM_000823	TCACCATCCTGGTTGTCTCT	20	GCAGCATCCTTCAGGAACAC	20	112
CRH-R1	NM_004382	TTTTCAACATCGTCCGCATC	20	GGGATTGACGAAGAACAGCA	20	143
GHSR1a	NM_198407.2	TGAAAATGCTGGCTGTAGTGG	21	AGGACAAAGGACACGAGGTTG	21	148
AVPR1b	NM_000707.3	ACAAGAATGCCCTGATGAA	20	GGCTGTTGAAGCCCATGTAG	20	111
KI67	NM_002417	GACATCCGTATCCAGCTTCCT	21	GCCGTACAGGCTCATCAATAAC	22	139
PTTG1	NM_004219.2	GGTGTTAAGACCTGCAATAATC	23	TTCAGCCCATCCTTAGCAAC	20	101

Verificación de la especificidad de los cebadores (primers)

Para verificar la especificidad de los cebadores, como se ha descrito previamente¹⁷, cada pareja de cebadores se utilizó en PCR convencional (DreamTaq DNA Polymerase, Thermo Scientific, Wilmington, NC, EE. UU.) para amplificar ADN copia generado por transcripción inversa, proveniente de tejido hipofisario humano. El perfil térmico consiste en un paso de 10 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de un minuto a 95 °C, un minuto a 60-64 °C y un minuto a 72 °C. Los productos se corrieron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para confirmar la presencia de una única banda del tamaño esperado y la ausencia de dímeros de cebadores. Una alícuota del producto de PCR se purificó mediante el kit AccuPrep Gel Purification Kit (K3035, Bioneer, Alameda, CA, EE. UU.), y se realizó la secuenciación para confirmar la especificidad de los cebadores. Se utilizó el producto de PCR convencional para la construcción de curvas estándar para PCR cuantitativa. Para confirmar la eficiencia de los cebadores y construir las curvas estándar, el primer ensayo con qPCR se realiza haciendo una dilución 1:2 de la transcripción inversa, en la que la eficiencia óptima se demuestra por una diferencia de una Ct entre ambas diluciones. Los detalles de reactivos para qPCR se muestran en el siguiente apartado. Se determinó la concentración del producto purificado mediante PicoGreen DNA quantification kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.) y los productos

de PCR se diluyeron de forma secuencial, obteniendo estándares de 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ y 10⁶ copias del transcrito por microlitro. Un microlitro de cada punto de la curva se amplifica por qPCR y se genera, por tanto, una curva estándar que relaciona Ct y n.º de copias. Los valores de R² generados de la recta se encontraron entre 0,997 y 1,003; se aceptaron las parejas de cebadores con una eficiencia entre 90 y 110%; una eficiencia del 100% indica que se amplifican todos los transcritos en cada ciclo. Si todos los parámetros de validación eran adecuados, se seleccionó la pareja de primers y sus condiciones de reacción se utilizaron para amplificar el ADN copia de las muestras tumorales.

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La medida de expresión génica se hace mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se ha utilizado MasterMix Brilliant III ultrafast SYBRGreen QPCR (#600882, Agilent, La Jolla, CA, EE. UU.), placas de 96 pocillos y tapas (#B70501 y #B79791B, respectivamente, Bioplastic, Landgraaf, Países Bajos). La reacción es la siguiente: 10 µL de MasterMix, 1 µL de ADN copia, 150 nM de cada uno de los cebadores y hasta 20 µL de agua DEPC. El perfil térmico consiste en un paso de 3 min a 95 °C, 40 ciclos de 20 s a 95 °C, seguidos de 20 s a 60 °C y un paso final de disociación, un minuto a 95 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 95 °C. El resultado de la qPCR es un valor de Ct que, al introducirse en la ecuación de la curva estándar, genera un valor de expresión en número de copias. La extrapolación se

realiza utilizando un gráfico de dispersión con los exponentes de dilución 1, 2, 3, 4, 5 y 6 y los correspondientes valores de Ct obtenidos en la qPCR, generándose así una recta y su subsiguiente ecuación de la recta: $y = mx + q$, donde m es la pendiente de la recta, que debe aproximarse a 3,3, que es la diferencia de Ct entre las distintas diluciones, y q es el punto de intersección con el eje y, el valor de Ct de la muestra es el valor de x ; así, al sustituir se obtiene el valor en número de copias.

Correlación de la expresión con las características clínicas y patológicas, el comportamiento y la progresión tumoral

Los resultados obtenidos en las secciones descritas anteriormente se agrupan por tipo de tumor y de acuerdo con los tratamientos y tests desarrollados y, sobre esta base, los registros médicos de los pacientes se revisaron evaluando sus principales características.

Análisis estadístico

La diferente naturaleza de las variables de estudio requiere un análisis detallado de los datos. Se han realizado tests de Komogorov-Smirnov para determinar la similitud de los diferentes conjuntos de datos con una distribución normal. Para la comparación de variables con distribuciones paramétricas se ha realizado el test de t de Student, y en el caso de las no paramétricas, la prueba de Mann-Whitney. Para más de 2 grupos se han realizado tests de Kruskal-Wallis. El análisis de las correlaciones se ha realizado mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Resultados

Casos registrados

El proyecto REMAH ha ido incorporando desde su inicio un número creciente de investigadores con acceso autorizado a la base de datos. Al finalizar la primera fase del proyecto, se cuenta con un total de 141 investigadores, cuya distribución geográfica se detalla en la [tabla 2](#).

Tabla 2 Investigadores registrados por nodos

Nodo	
Córdoba/Andalucía	26
Madrid/Comunidad de Madrid	47
Santiago de Compostela/Galicia	19
Barcelona/Cataluña	20
Bilbao/País Vasco	13
Alicante/Comunidad Valenciana	16
Total investigadores	141

El registro acumulado en la base de datos del REMAH en esta primera fase cuenta con un total de 1.179 entradas, correspondientes a enfermedad hipofisaria registrada con código REMAH ([tabla 3](#)). Destacan por su abundancia los adenomas hipofisarios no funcionantes (562), seguidos de acromegalias (309) y enfermedad de Cushing (159). En general, la distribución de la prevalencia de las distintas enfermedades se mantiene con frecuencias similares en los distintos nodos.

De la muestra total de 1.179 casos registrados, el número de casos con datos moleculares anotados es de 704, correspondientes a los nodos de Córdoba, Alicante, Barcelona, Madrid y Santiago de Compostela. En la [tabla 4](#) se recoge la distribución de los tumores registrados con información molecular, según su tipología y el nodo donde se ha registrado, y los datos moleculares que se consideran inicialmente válidos para abordar un análisis estadístico, 534 en este caso (total/validados). En este registro también se han incluido craneofaringiomas y tumores secretores de ACTH ectópicos, debido a su asociación con enfermedad hipofisaria.

La evaluación de la estabilidad de los 3 genes de control medidos inicialmente en el estudio, ACTB, GAPDH y HPRT, demuestra que la expresión de HPRT es notablemente más estable que la de los otros 2. Por ello, para realizar las comparaciones de niveles de expresión y las correlaciones con niveles bioquímicos, se ha decidido utilizar en adelante datos ajustados por HPRT.

Tabla 3 Registro acumulativo de muestras y prevalencia de las enfermedades correspondientes según su fenotipado clínico. Por año, desde 2010 hasta 2015

Enfermedad	31/12/2010	31/12/2011	31/12/2012	31/07/2013	31/12/2014	Final
Acromegalia	65	122	192	231	294	309
No funcionante	54	155	290	365	540	562
Cushing hipofisario	23	52	90	104	152	159
Prolactinoma	8	16	28	37	59	63
Tirotropinoma	4	8	9	9	12	12
Gonadotropinoma	2	8	9	17	29	29
Corticotropinoma silente	1	3	3	6	6	6
Otros	6	11	23	28	36	39
Total	163	375	644	797	1.128	1.179

Otros: corresponde a otros tumores y lesiones hipofisarios que no concuerdan con las demás categorías o que debido a su baja incidencia no se han categorizado aparte; entre ellos se encuentran apoplejías hipofisarias, gonadotropinomas silentes, cordomas, oncocitomas y adenomas plurihormonales. Además se han incluido en este apartado los craneofaringiomas y los Cushing ectópicos, que, a pesar de no ser adenomas hipofisarios, son dolencias que tienen una relación estrecha con estos.

Tabla 4 Distribución de las muestras registradas con fenotipo molecular disponible/validado, en función del tipo de tumor y del nodo de registro

Moleculares	Córdoba	Alicante	Madrid	Barcelona	Santiago	Total
Acromegalia	87/84	39/36	26/24	27/26	16/13	195/185
No funcionante	104/72	76/51	54/32	56/45	33/23	323/223
Cushing	39/26	22/18	10/6	21/7	4/2	96/59
Cushing silente	3/3	2/2	0/0	0/0	0/0	5/5
Prolactinoma	10/8	8/5	5/4	15/13	1/1	39/31
Gonadotropinoma	4/4	5/5	12/12	0/0	1/1	22/22
Tirotropinoma	5/5	2/2	1/1	0/0	1/1	9/9
Otros	3/0	6/0	2/0	1/0	2/0	15/0
Total	256/204	160/119	110/79	120/91	58/41	704/534

Otros: ver [tabla 3](#).

Tabla 5 Datos demográficos básicos de los somatotropinomas registrados

Acromegalia	N (%)	Edad [mediana (min-max)]	Macroadenoma (%)
Hombre	84 (43)	40 (12-74)	55/64 (86)
Mujer	111 (57)	48 (14-79)	69/86 (80)
Total	195	43 (12-79)	124/150 (83)

Somatotropinomas causantes de acromegalia

Se han registrado 195 somatotropinomas anotados, de los que se ha validado el perfil molecular de 185. Los datos demográficos básicos ([tabla 5](#)) muestran que, en los pacientes del presente estudio, la acromegalia tiene una mayor incidencia en mujeres. La edad de los pacientes en el momento de la cirugía es significativamente menor en el caso de los hombres ($p=0,005$). En ambos sexos, la gran mayoría de tumores, por encima del 80%, son macroadenomas.

Adenomas hipofisarios no funcionantes

El tipo de tumores más abundante del estudio es el de los adenomas hipofisarios no funcionantes, lo que coincide con lo esperado por su mayor incidencia y prevalencia en la población general respecto al resto de adenomas. En esta primera fase del REMAH, se ha iniciado un análisis molecular de 223 adenomas no funcionantes de los 326 registrados ([tabla 6](#)). Se seleccionaron los adenomas con un perfil más

Tabla 6 Datos demográficos básicos de los adenomas no funcionantes registrados

No funcionante	N (%)	Edad [mediana (min-max)]	Macroadenoma (%)
Hombre	187 (57)	61 (16-81)	126/126 (100)
Mujer	139 (43)	55 (19-87)	99/102 (97)
Total	323 ^a	58 (16-87)	225/228 (99)

^a Hubo 3 adenomas con datos demográficos incompletos.

compatible con el de adenoma no funcionante, y se han pospuesto para un estudio más detallado y minucioso aquellos que, pese a haber sido diagnosticados clínicamente como no funcionantes, mostraron un perfil molecular menos evidente, que pudiera corresponder a tumores silentes o a estadios no sintomáticos de una enfermedad de otra naturaleza. Los resultados obtenidos en el subgrupo seleccionado indican que los adenomas no funcionantes presentan una mayor incidencia en hombres, en los que, además, la edad en el momento de la cirugía tiende a ser superior que en las mujeres ($p=0,052$). Como era de esperar, en ambos sexos se trató casi en su totalidad de macroadenomas, ya que la cirugía no está indicada en caso de microadenomas no funcionantes.

Corticotropinomas causantes de la enfermedad de Cushing

La colección de muestras anotadas en REMAH ha permitido comenzar el análisis molecular de 59 de los 96 corticotropinomas causantes de la enfermedad de Cushing. Solo se han considerado válidos un 61% de los adenomas recogidos, ya que en muchos casos el análisis molecular reveló que la muestra analizada no se trataba de un adenoma corticotropo, sino que correspondía a un fragmento de glándula hipofisaria no tumoral, pues destacaba la expresión de GH y PRL, seguida de POMC y del resto de las hormonas adenohipofisarias: este es el perfil de expresión hormonal típico de la hipófisis normal.

En la muestra analizada ([tabla 7](#)), de la que casi 2 tercios fueron microadenomas, la incidencia es muy superior en mujeres que en hombres, mientras que no se observaron diferencias significativas entre las edades en ambos sexos.

Tabla 7 Datos demográficos básicos de los corticotropinomas causantes de enfermedad de Cushing registrados

E. de Cushing	N (%)	Edad [mediana (min-max)]	Macroadenoma (%)
Hombre	18 (19)	35 (19-75)	7/16 (43)
Mujer	78 (81)	42 (15-75)	20/56 (36)
Total	96	41 (15-75)	27/72 (38)

Tabla 8 Datos demográficos básicos de los prolactinomas registrados

Prolactinoma	N (%)	Edad [mediana (min-max)]	Macroadenoma (%)
Hombre	22 (56)	35 (14-73)	13/13 (100)
Mujer	17 (43)	48 (16-65)	10/11 (90)
Total	39	34 (14-73)	23/24 (96)

Adenomas lactotropos causantes de hiperprolactinemia

El cuarto tipo de tumor por su prevalencia en la serie registrada es el de los prolactinomas, causantes de hiperprolactinemia. Se ha realizado el análisis molecular en 31 de los 39 prolactinomas registrados (tabla 8). Puesto que este tipo de tumores tiene como primera línea de tratamiento la aplicación de agonistas dopaminérgicos, que con frecuencia permiten controlar e incluso resolver la enfermedad, los prolactinomas que se intervienen quirúrgicamente suelen ser casi siempre macroadenomas, que en esta serie son algo más frecuentes en hombres.

Discusión

El proyecto REMAH nacional ha completado satisfactoriamente su primera fase, con el establecimiento de un protocolo normalizado de trabajo, recolección de muestras, registro y anotación de pacientes y un primer análisis demográfico de la población registrada.

Desde un punto de vista práctico, los resultados obtenidos indican:

1. La capacidad del proyecto para reclutar un número considerable (141) de investigadores clínicos y básicos para la recolección de pacientes y análisis de muestras, así como para su registro y estudio conjunto.
2. El desarrollo de una base de datos conjunta clínico-molecular de acceso por Internet, que sirve de base para el desarrollo actual y futuro del proyecto. Su uso es ya factible para el apoyo al diagnóstico y su mejora permitirá un uso más rápido y dinámico en esa vertiente y una mayor proyección de cara al desarrollo de futuros proyectos de diversa índole.
3. Se puede afirmar que el elevado número de pacientes y muestras registrado, su variedad y tipología, unidos a la caracterización molecular del tejido y al estudio clínico detallado de los casos constituyen, en su conjunto, un logro sin precedentes en el ámbito de la investigación y estudio de la enfermedad tumoral hipofisaria, no solo a nivel nacional sino también a nivel internacional.
4. El sencillo análisis descriptivo de los datos demográficos de los casos analizados y de los perfiles moleculares evaluados para los principales tipos de adenomas hipofisarios ha puesto de manifiesto el considerable valor de la información generada, tanto a nivel global como, lo que seguramente será más importante, a nivel individual de cada paciente.

5. El trabajo que se debe desarrollar a partir de ahora para sacar el máximo partido a los datos registrados y las medidas realizadas, y para extraer del proyecto REMAH el máximo valor de cara al futuro, es complejo y será necesariamente laborioso, pero también es de un interés extraordinario.

Los resultados obtenidos hasta la fecha, junto con la consecución de los principales hitos y objetivos marcados inicialmente, permiten afirmar que el lanzamiento y puesta en funcionamiento de este proyecto ha alcanzado un nivel adecuado de desarrollo y compleción. Así, lo logrado hasta este punto permite proponer, por una parte, la continuidad de la estrategia diseñada en una segunda fase que incluya las mejoras que se consideren pertinentes, en cuanto a revisión y reestructuración de los genes de medida y parámetros clínicos seleccionados, y, por otra, el diseño y puesta en marcha de nuevas acciones derivadas de los hallazgos realizados y, sobre todo, de los resultados obtenidos, que representan un producto de un valor considerable por la información que contienen en sí mismos los registros realizados y por su potencial como base de elaboración de nuevos estudios e iniciativas.

Conflicto de intereses

Montserrat Gilabert es una empleada de Novartis Farmacéutica. El resto de autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

El proyecto REMAH ha sido posible gracias al patrocinio de Novartis, la Fundación FSEEN y la SAEN. Han contribuido asimismo en distinta medida los proyectos de investigación de los propios autores. Agradecemos a todos los investigadores, técnicos y personal sanitario que han contribuido al desarrollo del proyecto, así como, de forma principal y destacada, a los pacientes y sus familias por su generosa contribución.

Anexo. Investigadores REMAH

Nodo Madrid:

Magdalena Adrados, Hospital Universitario de La Princesa
Pedro Martínez Flores, Hospital Universitario de La Princesa

Ana María Ramos Leví, Hospital Universitario de La Princesa

Miguel Sampedro-Núñez, Hospital Universitario de La Princesa

Ana Serrano-Somavilla, Hospital Universitario de La Princesa

María Paz de Miguel Novoa, Hospital Clínico San Carlos
Juan José Díez, Hospital Ramón y Cajal

Mercedes García Villanueva, Hospital Ramón y Cajal
Pedro Iglesias, Hospital Ramón y Cajal

Víctor Rodríguez Berrocal, Hospital Ramón y Cajal

Concepción Blanco Carrerra, Hospital Príncipe de Asturias
Esperanza Aguillo Gutiérrez, Hospital Clínico Zaragoza

Luciano Bances, Hospital Clínico Zaragoza

Fernando L. Calvo Gracia, Hospital Clínico Zaragoza

Fernando Comuñas, Hospital Clínico Zaragoza
 Iván Quiroga López, Hospital de Talavera
 Carmen Alameda Hernando, Hospital Infanta Sofía
 Jesús Miguel Pérez Luis, Hospital Universitario de Tene-
 rife

Rogelio García Centeno, Hospital Gregorio Marañón
 Begoña Iza, Hospital Gregorio Marañón
 Álvaro Pérez Zamarrón, Hospital La Paz
 José F. Alén, Hospital 12 de Octubre
 María Calatayud Gutiérrez, Hospital 12 de Octubre
 Igor Paredes Sansinenea, Hospital 12 de Octubre
 Álvaro Otero, Hospital Clínico de Salamanca
 José María Recio Córdova, Hospital Clínico de Salamanca
 Pablo Sousa, Hospital Clínico de Salamanca
 José Belinchón, Hospital Virgen de la Salud
 María José Herguido, Hospital Virgen de la Salud
 Ángel Rodríguez de Lope, Hospital Virgen de la Salud
 Almudena Vicente Delgado, Hospital Virgen de la Salud

Nodo Barcelona:

Iris Crespo, Hospital de Sant Pau
 Fernando Muñoz, Hospital de Sant Pau
 Eugenia Resmini, Hospital de Sant Pau
 Olga Roig, Hospital de Sant Pau
 Alicia Santos, Hospital de Sant Pau
 Pere Tresserras, Hospital de Sant Pau
 Carlos del Pozo Pico, Mutua de Terrassa
 Alberto Torres, Hospital de Bellvitge
 Noemí Vidal, Hospital de Bellvitge
 Carles Villabona, Hospital de Bellvitge
 Gemma Sesmió, Centro Médico Teknon
 Guillermo Cuatrecasas Cambra, Centro Médico Teknon
 Joaquim Enseñat, Hospital Clinic Barcelona
 Irene Halperin, Hospital Clinic Barcelona
 Gabriel Obiols, Hospital Vall d'Hebron
 Cristina Carrato, Hospital Germans Trias
 Isabel Salinas, Hospital Germans Trias
 Roxana Zabala, Hospital Germans Trias
 Laura Cecenarro, Hospital Germans Trias
 Raquel Buj, Hospital Germans Trias
 Mireia Jordá, Hospital Germans Trias
 Cristina Hostalot, Hospital Germans Trias
 Javier Ibáñez Domínguez, Hospital Universitario Son

Espases

Honorato García Fernández, Hospital Universitario Son

Espases

Guillermo Serra, Hospital Universitario Son Espases

Nodo Alicante:

Pedro Riesgo, Hospital de La Ribera
 Rosa Cámara, Hospital La Fe
 Juan Antonio Simal-Julian, Hospital La Fe
 Cristina Lamas, Hospital General de Albacete
 Hernán Sandoval, Hospital General de Albacete
 Javier Abarca, Hospital General de Alicante
 Nieves Arias Mendoza, Hospital General de Alicante
 Ruth Sánchez Ortiga, Hospital General de Alicante
 Irene Monjas, Hospital General de Alicante
 Teresa Pedro Font, Hospital de Denia

Nodo Santiago:

Isabel Alonso Troncoso, Complejo Hospitalario Ponte-
 vedra
 Pablo Fernández Catalina, Complejo Hospitalario Ponte-
 vedra

Rosa María Álvarez San Martín, Complejo Asistencial de
 León

María D. Ballesteros Pomar, Complejo Asistencial de León
 Rocío Villar Taibo, Complejo Asistencial de León

Sihara Pérez Romero, Universidad Santiago Compostela
 Eva Fernández Rodríguez, Hospital Clínico Universitario
 de Santiago

Alfredo García-Allut, Hospital Clínico Universitario de
 Santiago

Ramón Serramito, Hospital Clínico Universitario de San-
 tiago

Alma Prieto, Hospital el Bierzo (León)

Laura Cotovad Bellas, Complejo Hospitalario Arquitecto
 Marcide

Jose Ignacio Vidal Pardo, Complejo Hospitalario Xeral-
 Calde

Nodo Córdoba:

Juan Antonio García Arnés, Hospital Universitario Carlos
 Haya

Inmaculada González-Molero, Hospital Universitario Car-
 los Haya

Silvia María Maraver Selfa, Hospital Virgen de la Victoria
 Francisco J. Tinahones Madueño, Hospital Virgen de la

Victoria

María Rosa Alhambra Expósito, Hospital Universitario
 Reina Sofía

Paloma Moreno Moreno, Hospital Universitario Reina Sofía
 Andrés de la Riva, Hospital Universitario Reina Sofía

Elena Torres Vela, Hospital Universitario San Cecilio

Miguel Ángel Japón, Hospital Virgen del Rocío

María Elena Dios Fuentes, Hospital Virgen del Rocío

Natividad González Rivera, Hospital de la Macarena

Tomas Martín Hernández, Hospital de la Macarena

Inmaculada Gavilán Villarejo, Hospital Universitario
 Puerta del Mar Cádiz

José Gregorio Oliva García, Hospital Universitario Nues-
 tra Señora de la Candelaria

Judith López Fernández, Hospital Universitario de
 Canarias

Alberto Moreno Carazo, Complejo Hospitalario de Jaén

Bibliografía

1. Alexander JM, Biller BM, Bikkal H, Zervas NT, Arnold A, Klibanski A. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest.* 1990;86:336-40.
2. Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71:1427-33.
3. Melmed S. Pituitary neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1994;23:81-92.
4. Ezzat S, Asa SL. Mechanisms of disease: The pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006;2:220-30.
5. Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:97-126.
6. Melmed S. Acromegaly pathogenesis and treatment. *J Clin Invest.* 2009;119:3189-202.
7. Colao A. Pituitary tumours: The prolactinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23:575-96.
8. Feelders RA, Hofland LJ. Medical treatment of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:425-38.

9. Beck-Peccoz P, Persani L, Mannavola D, Campi I. Pituitary tumours: TSH-secreting adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23:597–606.
10. Chaidarun SS, Klibanski A. Gonadotropinomas. *Semin Reprod Med.* 2002;20:339–48.
11. Colao A, Di Somma C, Pivonello R, Faggiano A, Lombardi G, Savastano S. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15:905–15.
12. Cohen LE, Radovick S. Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies. *Endocr Rev.* 2002;23:431–42.
13. Kannan S, Staugaitis SM, Weil RJ, Hatipoglu B. A rare corticotroph-secreting tumor with coexisting prolactin and growth hormone staining cells. *Case Rep Endocrinol.* 2012;2012:529730.
14. Trouillas J, Roy P, Sturm N, Dantony E, Cortet-Rudelli C, Vignet G, et al. A new prognostic clinicopathological classification of pituitary adenomas: A multicentric case-control study of 410 patients with 8 years post-operative follow-up. *Acta Neuropathol.* 2013;126:123–35.
15. Mete O, Asa SL. Therapeutic implications of accurate classification of pituitary adenomas. *Semin Diagn Pathol.* 2013;30:158–64.
16. Neto LV, Machado Ede O, Luque RM, Taboada GF, Marcondes JB, Chimelli LM, et al. Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1931–7.
17. Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimaraes RF, Marcondes JB, Chimelli LM, et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:65–74.
18. Taboada GF, Luque RM, Neto LV, Machado Ede O, Sbaiffi BC, Domingues RC, et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtypes (1-5) gene expression levels in somatotropinomas and correlation to in vivo hormonal and tumor volume responses to treatment with octreotide LAR. *Eur J Endocrinol.* 2008;158:295–303.
19. Heaney AP, Melmed S. Molecular targets in pituitary tumours. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:285–95.
20. Melmed S. Update in pituitary disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:331–8.
21. Chinezu L, Vasiljevic A, Jouanneau E, Francois P, Borda A, Trouillas J, et al. Expression of somatostatin receptors, SSTR2A and SSTR5, in 108 endocrine pituitary tumors using immunohistochemical detection with new specific monoclonal antibodies. *Hum Pathol.* 2014;45:71–7.
22. Ferone D, Gatto F, Arvigo M, Resmini E, Boschetti M, Teti C, et al. The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol.* 2009;42:361–70.
23. Hofland LJ, Feelders RA, de Herder WW, Lamberts SW. Pituitary tumours: The sst/D2 receptors as molecular targets. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;326:89–98.
24. Theodoropoulou M, Stalla GK. Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol.* 2013;34:228–52.
25. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 1996;273:974–7.
26. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997;48:23–9.
27. Korbonits M, Jacobs RA, Aylwin SJ, Burrin JM, Dahia PL, Monson JP, et al. Expression of the growth hormone secretagogue receptor in pituitary adenomas and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3624–30.
28. Gahete MD, Rincón-Fernández D, Villa-Osaba A, Hormaechea-Agulla D, Ibáñez-Costa A, Martínez-Fuentes AJ, et al. Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: Biological and pathophysiological insight. *J Endocrinol.* 2014;220:R1–24.
29. Ibáñez-Costa A, Gahete MD, Rivero-Cortés E, Rincón-Fernández D, Nelson R, Beltran M, et al. In1-ghrelin splicing variant is overexpressed in pituitary adenomas and increases their aggressive features. *Sci Rep.* 2015;5:8714.
30. Koshimizu A, Nakamura TA, Egashira K, Hiroshima N, Nonoguchi M, Tanoue H. Vasopressin V1a, and V1b receptors: From molecules to physiological systems. *Physiol Rev.* 2012;92:1813–64.
31. Leal-Cerro A, Martín-Rodríguez JF, Ibanez-Costa A, Madrazo-Atutxa A, Venegas-Moreno E, Leon-Justel A, et al. Desmopressin test in the diagnosis and follow-up of cyclical Cushing's disease. *Endocrinol Nutr.* 2014;61:69–76.
32. Luque RM, Ibáñez-Costa A, López-Sánchez LM, Jimenez-Reina L, Venegas-Moreno E, Galvez MA, et al. A cellular and molecular basis for the selective desmopressin-induced ACTH release in Cushing disease patients: Key role of AVPR1b receptor and potential therapeutic implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:4160–9.
33. Mete O, Ezzat S, Asa SL. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol.* 2012;49:R69–78.
34. Sav A, Rotondo F, Syro LV, Scheithauer BW, Kovacs K. Biomarkers of pituitary neoplasms. *Anticancer Res.* 2012;32:4639–54.
35. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007;23:1289–91.
36. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:e115.