



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

11262

31

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION

PREVALENCIA DE LA MUTACION DEL GEN GSP ALFA EN
PACIENTES ACROMEGALICOS MEXICANOS Y SUS
CARACTERISTICAS CLINICAS, BIOQUIMICAS Y
ESTRUCTURALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A :

VICTORIA MENDOZA ZUBIETA

TOTUR: DR. MOISES MERCADO ATRI

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

DEDICATORIA:

A Pamela, Luis y Victor

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: VICTORIA
MARCELA ZUBIETA
FECHA: 30/01/2003
FIRMA: [Signature]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

INDICE

	Página
RESUMEN	2
SUMMARY	3
I.- INTRODUCCIÓN	
SECRETION NORMAL DE LA GH.	4
ACROMEGALIA	5
Epidemiología	5
Mortalidad	5
Etiopatogenia	6
Características clínicas	6
Criterios diagnósticos	7
Tratamiento y pronóstico	7
ONCOGENESIS DE LA ACROMEGALIA	10
SINDROME DE McCUNE-ALBRIGHT	16
II.-JUSTIFICACION	17
III.-OBJETIVOS	18
IV.-HIPOTESIS	18
V.-MATERIAL Y METODOS	19
DISEÑO DEL ESTUDIO	19
METODOS :	20
EXTRACCIÓN DE DNA	21
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA	22
SECUENCIACION	24
VI.-ANALISIS ESTADÍSTICO	24
VII.-RESULTADOS	24
VIII.- DISCUSIÓN	30
IX.-BIBLIOGRAFIA	34

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Los tumores hipofisarios en general y los adenomas secretores de GH en particular, son neoplasias monoclonales que resultan de una compleja interacción de eventos oncogénicos. Uno de estos eventos es la mutación somática del gen de la subunidad alfa de la proteína Gs que esta asociada al receptor de la GHRH. La proteína Gs inicia la traducción de la señal de la GHRH por un incremento de la actividad de la adenilato ciclasa, que cuando está activa genera cAMP. Se ha descrito que las mutaciones ocurren en el codón 201 (exón 8, Arg→Cis o His) y más rara vez en el 227 (exón 9, Gln→Arg o Leu) produciendo activación constitutiva por abolición de su actividad GTPasa. La acromegalia es una enfermedad rara, con una prevalencia estimada de 50 casos por millón. En más del 95% de los casos es causada por un adenoma productor de GH en la glándula hipófisis. Estas mutaciones se han descrito en aproximadamente el 40% de los pacientes caucásicos con acromegalia y se han asociado a una evolución más benigna de la enfermedad y a una mejor respuesta a los análogos de la somatostatina. Por otro lado, en la prevalencia de las mutaciones del gen Gs α , se ha encontrado una variabilidad étnica y geográfica ya que en las poblaciones orientales se ha reportado que ocurren solamente en el 4 a 9% de los pacientes. El propósito de este estudio es estimar la prevalencia de las mutaciones Gs α en pacientes mexicanos con acromegalia y estimar su asociación con las características clínicas de la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS. Fueron incluidos 58 pacientes con diagnóstico clínico y bioquímico de acromegalia, 23 hombres y 35 mujeres. La edad promedio fue de 38.6 años (rango 21 a 80). El diagnóstico bioquímico fue establecido por la ausencia de supresión de la GH a < de 2 ng/mL después de la administración de 75g de glucosa y por niveles elevados de IGF-1 ajustados a la edad y sexo. 51 tenían macroadenomas y 7 microadenomas. El DNA genómico fue aislado por métodos convencionales de tumores obtenidos durante la cirugía transesfenoidal en 37 pacientes y en los otros 21 casos el material genético fue obtenido de tejido tumoral incluido en parafina. En los casos en que se obtuvo el DNA directamente del tumor, se realizó PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar los exones 8 y 9. En el DNA obtenido de tejidos incluidos en parafina, los exones 8 y 9 fueron amplificados en forma separada. Todos los productos amplificados fueron visualizados y extraídos de gel de agarosa al 2% y secuenciados por el método de dideoxi. La asociación de la presencia o ausencia de la mutación con los parámetros clínicos y bioquímicos se determinó mediante la prueba de Chi² y exacta de Fisher.

RESULTADOS. La mutación del gen Gs α se encontró en 11 pacientes en el exón 8 en el codón 201. En 8 tumores la mutación fue CGT→TGT (Arg→Cis) y en 3 CGT→CAT (Arg→His) No se encontraron mutaciones en el exón 9. La asociación de la presencia de la mutación con los datos clínicos no mostró diferencia significativa.

CONCLUSIÓN. La prevalencia de la mutación del gen Gs α en pacientes acromegálicos mexicanos es del 19%. No se encontró asociación entre la presencia de la mutación y el comportamiento clínico y biológico del tumor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUMMARY

Pituitary tumors in general, and GH-secreting adenomas in particular are monoclonal neoplasms that result from a complex interaction of several oncogenic events. One of these oncogenic events involves mutations of the alpha subunit of the Gs protein to which the GHRH receptor is coupled. This Gs protein initiates GHRH signal transduction by increasing guanylyl cyclase activity that in turn generates cAMP. The point mutations thus far described occur in residues 201 (exon 8) and 227 (exon 9) of the alpha subunit of the Gs protein, and result in constitutive activation due to abolition of its intrinsic GTPase activity. Acromegaly is rare disorder with an estimated prevalence of 50 cases per million. In over 95% of cases the condition is caused by a GH-secreting adenoma arising in the pituitary gland. As many as 40% of Caucasian patients with acromegaly have been found to harbor these mutations, and it has been suggested that the presence of such mutations is associated with a more benign course of the disease as well as a better response to therapy with somatostatin analogues. However, there is a marked ethnic variability in the prevalence of Gs α mutations, since in Oriental populations they occur in only 4 to 10 % of patients. The purpose of this study was to estimate the prevalence of Gs α mutations in Mexican patients with acromegaly and to determine if the prevalence of such mutations is associated in any way with the clinical outcome.

MATERIALS AND METHODS. 58 patients, 23 men and 35 women with acromegaly were studied. The mean age was 38.6 (range 21-80). The diagnosis was established biochemically by lack of glucose-induced GH suppression to < 2 ng/mL, as well as an elevated age- and sex-adjusted IGF-1 level. 51 had macroadenomas and 7 microadenomas. Genomic DNA was isolated by conventional methods from tumors obtained at transphenoidal surgery in 37 patients and in the other 21 cases, the genetic material was obtained from paraffin-embedded tumors. Exons 8 and 9 were amplified by PCR using specific primers, and products were automatically sequenced using the dideoxy termination method. Statistically significant correlations were sought between the presence or absence of mutations and different clinical and biochemical parameters using X2 and Fisher's exact tests.

RESULTS. Point mutations, all of them in exon 8, were found in 11 of 58 tumors. In 8 tumors the base change was CGT→TGT (Arg →Cys) and in 3, CGT→CAT (Arg→His). No mutations were found in exon 9. There was no significant correlation between the prevalence or absence of Gs α mutation and the presurgical GH level, the size of the tumor or the cure rate.

CONCLUSIONS. The prevalence of Gs α mutations in Mexican acromegalics is 19%, intermediate between that found in Caucasians and Orientals populations. No mutations were found in exon 9 and no correlations could be established between the presence of mutations and the clinical/biological characteristics of the tumour.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.-INTRODUCCION

REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO.

En condiciones normales, la síntesis y liberación de la GH (hormona de crecimiento) se produce en las células somatotrópicas de la hipófisis anterior (1) La secreción de GH esta regulada por la secreción dual de dos péptidos hipotalámicos: la hormona liberadora de GH (GHRH) y la somatostatina u hormona inhibidora de la liberación de somatotropina (SRIF) (1,2)

La GHRH se produce en los cuerpos celulares de los núcleos arqueado y ventromedial del hipotálamo, los axones de estas neuronas se proyectan hacia la eminencia media y terminan en los capilares de la circulación portal. La liberación de GHRH dentro de los vasos portales se realiza en forma pulsátil y contribuye en el patrón de secreción de la GH (3) Una vez que llega a la hipófisis, la GHRH actúa mediante la unión a receptores específicos de la familia de receptores de 7 asas transmembrana que están asociados a proteínas Gs (estimuladoras) (1) La unión de GHRH a su receptor inicia la traducción de la señal mediante la activación de la proteína Gs que estimula a la adenilato ciclasa y cataliza la síntesis de AMPc (adenocin monofosfato cíclico). El aumento de AMPc mediante la activación de la proteína quinasa A produce la transcripción de genes diana específicos. De esta manera, la GHRH estimula tanto la transcripción síntesis y liberación de la GH así como la proliferación celular del somatotropo (1-3)

La somatostatina es el principal péptido hipotalámico que inhibe la secreción hipofisaria de GH (1-3) La somatostatina es liberada a la circulación portal en forma episódica y suprime la secreción de GH en forma tónica mediante su unión a receptores específicos de 7 asas transmembrana que se encuentran asociados a las proteínas Gi (inhibidoras) que disminuyen la síntesis de AMPc (1-4) El SRIF se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso y en otros tejidos de origen neuroectodérmico (4)

Una vez secretada por la glándula hipófisis la GH ingresa a la circulación y actúa en órganos periféricos y estimula la producción del factor de crecimiento insulinoide o tipo I (IGF-I) La IGF-I media muchas de las acciones de la GH que promueven el crecimiento, aunque la GH por sí misma puede tener efecto directo en procesos metabólicos y en la promoción del crecimiento (1-4) El sistema de retroalimentación involucra GH, IGF-I,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GHRH y SRIF que regulan de una manera estricta el equilibrio del eje somatotrópico. Otros factores cuyo efecto se sobrepone a la acción de estos péptidos, en la secreción de GH, son neurotransmisores que actúan en el cerebro e hipotálamo, así mismo se ha sugerido que otros factores paracrinos y autocrinos dentro del tejido hipofisario, pueden modular la secreción de GH (2)

ACROMEGALIA.

La acromegalia es una enfermedad que resulta de la síntesis y liberación excesivas de la GH. Cuando este trastorno ocurre antes de la fusión de las epífisis óseas (antes de la pubertad), la condición que resulta es el gigantismo. Si este exceso de GH ocurre después de la pubertad, el resultado es acromegalia, cuyo marco clínico general es el crecimiento de las partes blandas y los órganos internos (5) La acromegalia afecta por igual a ambos sexos, se presenta mas frecuentemente entre 40 y 50 años. La acromegalia es una enfermedad crónica, el promedio de retraso en el diagnóstico desde el inicio de los síntomas se calcula que es de aproximadamente 8 años (6)

EPIDEMIOLOGIA

La acromegalia es una enfermedad poco frecuente, tiene una prevalencia de entre 40 a 60 casos por millón de habitantes y una incidencia de 3 casos por millón por año. (7,8) El Servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades del CMN, concentra una gran cantidad de casos neuroendocrinológicos. Mensualmente, nuestro Servicio evalúa aproximadamente 1 paciente nuevo con acromegalia. Lo anterior representa una incidencia de 2 a 3 casos por millón por año de derechohabientes.

MORTALIDAD

La importancia de este padecimiento estriba en que no sólo produce deformidades somáticas importantes, si no que también resulta en una morbimortalidad cardiovascular y neoplásica excesiva, hasta 2 a 4 veces mayor comparada con la población general (9,10) Los factores asociados a este incremento en la mortalidad son los niveles de GH e IGF-I (factor de crecimiento insulinoide tipo I), así mismo la duración de la enfermedad, la edad del paciente, y la presencia de diabetes e hipertensión arterial (6) Este aumento en la morbimortalidad se iguala al de la población general cuando los niveles de GH con el tratamiento se reducen a $< 2.5 \mu\text{g/L}$ (11).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ETIOPATOGENIA.

En más del 99% de los casos la secreción excesiva de GH es secundaria a un adenoma del somatotropo hipofisario (12) Según los estudios de microscopía electrónica e inmunohistoquímico estos tumores pueden ser escasos o densamente granulados. En algunos casos, el adenoma coproduce también prolactina (adenomas mixtos y mamosomatotropos (productores de prolactina y GH) de células estaminales y plurihormonales (13,14) Otras formas poco frecuentes se mencionan en la tabla 1

Tabla 1: Clasificación etiológica de la acromegalia

CAUSAS	TIPOS
Adenoma hipofisario (99%)	<ul style="list-style-type: none">• Adenoma somatotropo (densamente y escasamente granulado)• Adenoma mamosomatotropo• Adenoma acidófilo de células estaminales• Adenomas plurihormonales (GH, PRL, TSH)
Carcinoma Hipofisario	Carcinoma
Secreción ectópica GHRH	Intracranal: hamartoma, gangliocitoma hipotalámico Extracranal: carcinoide en páncreas, pulmón, intestino
Secreción ectópica de GH.	Intracranal: adenomas en remanentes embrionarios Extracranal: páncreas, mama, pulmón, linfomas (15)
Síndromes hereditarios	<ul style="list-style-type: none">• Síndrome de McCune-Albright.• Neoplasia endocrina múltiple tipo I (NEM-1)• Acromegalia familiar• Síndrome de Carney

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ACROMEGALIA

Los cambios metabólicos de la acromegalia, tales como la hiperglucemia, la cetogénesis y la lipólisis, parecen ser consecuencia directa de la GH (6) La hiperglucemia es producida tanto por un aumento en la producción hepática de glucosa (vía gluconeogénesis), como por la resistencia a la insulina, con la resultante hiperinsulinemia (5,6) Las características clínicas de esta enfermedad se resumen en la tabla 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Características clínicas	Frecuencia
Sexo (% de hombres)	48%
Cambios acrales o faciales	98%
Alteraciones menstruales	72%
Hiperhidrosis	64%
Cefalea	55%
Parestesias/túnel del carpo	40%
Impotencia masculina	36%
Hipertensión	28%
Bocio	21%
Alteraciones campimétricas	19%
Diabetes mellitus	10-25%

El efecto de masa del tumor incluye cefalea, hasta en un 55% de los casos, alteración de los campos visuales con hemianopsia uni o bitemporal, y reducción de la agudeza visual por compromiso del nervio óptico. Los efectos locales severos se observan particularmente en pacientes jóvenes y se asocian a macroadenomas de comportamiento invasor (16,17)

CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE LA ACROMEGALIA

La GH se secreta en forma pulsátil, de manera que la determinación aleatoria de esta hormona nos dice poco sobre el estado funcional del eje somatotrópico. Desde hace muchos años, la prueba estándar para el diagnóstico y seguimiento postoperatorio de la acromegalia ha sido la supresión de GH con una carga de glucosa (16,17) En condiciones normales, la hiperglucemia, relativa o absoluta, inhibe la síntesis y secreción de GH, debido a un efecto hipotalámico de aumento en el tono somatostatinérgico. Para esta prueba, generalmente se administran 75 a 100 g de glucosa y se toman muestras para GH antes de la carga y a los 30, 60, 90 y 120 minutos. Con los ensayos ultrasensibles de GH (immunométricos), lo normal es que ésta suprima a 0.23 ng/mL en las mujeres y a 0.075 ng/mL en los hombres (8,18). Con los ensayos más convencionales (RIA), se debe considerar como normal una supresión de GH a menos de 1 ng/mL en cualquiera de los puntos (8,16) Es importante hacer notar que los criterios de supresión de GH por glucosa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

han cambiado a través del tiempo, ya que hace 10 años se consideraba como normal una supresión de 5 ng/mL. (19)

Se han desarrollado otras pruebas para diagnosticar acromegalia que obvian el problema de la pulsatilidad en la secreción de GH (20) La medición de los niveles de IGF-I (total y/o libre) distingue eficientemente entre sujetos acromegálicos y normales (21) Así, la IGF-I refleja o integra los niveles de 24 horas de GH (2,21) Hay que recordar, sin embargo, que los niveles de este péptido dependen fuertemente de la edad y el sexo del paciente, por lo que los resultados siempre tendrán que ajustarse correspondientemente (16,18) En forma similar, recientemente se han comenzado a utilizar los niveles de la proteína ligadora de IGF (IGFBP3), que también son dependientes de GH y que integran las concentraciones de esta hormona a lo largo de 2 a 3 días (22), también decaen con la edad y por lo tanto requieren de ajuste (22)

Las pruebas de estimulación con TRH y GnRH son poco usadas en la actualidad (2,8,17)

Es importante incluir en la evaluación diagnóstica de estos pacientes la determinación de la reserva de las hormonas hipofisarias. Así, se debe determinar prolactina, cortisol matutino, pruebas de función tiroidea con T4 libre y TSH y niveles de LH, FSH y testosterona o estradiol según el caso (6,8)

Los defectos en los campos visuales deben ser evaluados formalmente por campimetría. El estudio de imagen de elección para visualizar la zona sellar es sin duda la resonancia magnética (5,17). Los adenomas hipofisarios con base en su tamaño pueden ser microadenomas (menores de 1 cm) o macroadenomas (mayores de 1 cm) (6). Los tumores productores de GH son en un 65% macroadenomas, pero con las nuevas técnicas de imagen de la hipófisis, se detectan cada vez más en estadio de microadenomas (6)

TRATAMIENTO Y PRONOSTICO.

Los objetivos del tratamiento de la acromegalia son: 1) Eliminar los efectos deletéreos metabólicos, cardiovasculares, respiratorios y osteomusculares de la hipersomatotropinemia, 2) Aliviar el efecto de masa que esté produciendo el tumor, por compresión quiasmática y/o invasión de otras estructuras vecinas, 3) Realizar lo anterior causando el menor daño funcional y estructural al área hipotálamo-hipofisaria, y 4) Reducir la incrementada mortalidad que estos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pacientes tienen. El tratamiento de elección de la acromegalia sigue siendo la cirugía transfenoidal. Incluso los macroadenomas se abordan por vía transfenoidal, evitando así la elevada mortalidad de la cirugía transfrontal (6%) (19). Se sabe que mientras más grande y más invasivo sea el tumor, peor es el pronóstico de la acromegalia (23). Así mismo, mientras mayor sea el grado de hipersomatotropinemia basal, el porcentaje de curación es menor (19,24).

Es difícil estimar con precisión cual es la tasa de éxito, ya que a lo largo del tiempo, se han utilizado distintos criterios bioquímicos y clínicos para definir curación. Si uno analiza las series quirúrgicas, se encuentra con porcentajes de éxito de hasta 85% para microadenomas (19,23). Sin embargo, los criterios de curación son muy laxos, muchas veces toman solamente la reducción de los niveles de GH para etiquetar un caso como curado. Hay que recordar que la mejoría clínica no implica curación ni garantiza que el tumor no volverá a crecer. De manera que actualmente, la cura bioquímica se define como la supresión de GH por glucosa a menos de 1 ng/mL y la normalización de los niveles de IGF-I (25). Lo anterior usualmente se acompaña de resonancias postoperatorias sin evidencia de remanente tumoral (17,25). No obstante, existen casos que han mejorado clínicamente y que alcanzan criterios de curación por supresión de GH con glucosa pero no por niveles de IGF-I o viceversa. Estos pacientes son asincrónicos en la normalización de estas variables, mientras otros permanecen discrepantes por años hasta que la acromegalia "recurrer" o mejor dicho se reactiva, pues en realidad nunca curó por completo (19,26)

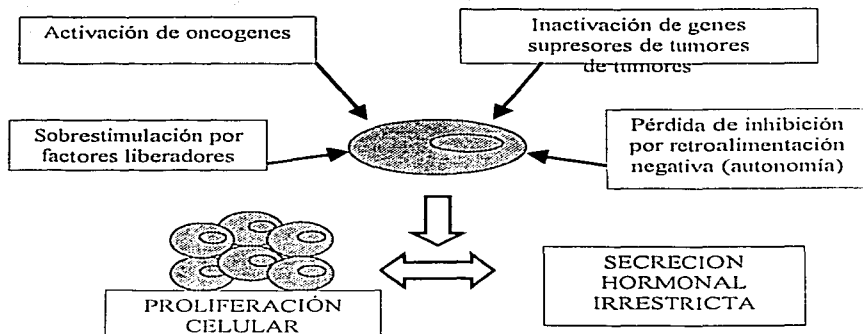
La radioterapia es poco efectiva como opción terapéutica en la acromegalia (27,28). La reducción en los niveles de GH tarda varios años y en forma inexorable, a los 10 años ya existe algún grado de hipopituitarismo aunque éste es menor con la radioterapia dirigida (gamma knife) (29). De manera que esta alternativa se reserva para aquellos casos en los que la resección ha sido incompleta por encontrarse el tumor invadiendo estructuras inaccesibles como el seno cavernoso y de primera intención en aquellos pacientes en los que existen contraindicaciones para la cirugía (27-29).

Desde hace más de 20 años se ha intentado el uso de agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina en el tratamiento de la acromegalia (30). A este respecto, los tumores mixtos (GH/PR) o mamosomatotropos son los que mejor responden (30). En los últimos 10 años ha resurgido el interés

TESIS CON
TABLA DE ORIGEN

en el tratamiento médico de la acromegalia gracias al desarrollo de los llamados análogos de la somatostatina de larga acción (31,32).

ONCOGENESIS DE LA ACROMEGALIA.



Los recientes avances en biología molecular nos han permitido entender mejor la patogénesis de los tumores hipofisarios (33). Mediante el método de inactivación del cromosoma X se ha establecido que los adenomas hipofisarios en general y los adenomas productores de GH en particular, son neoplasias monoclonales que resultan de la expansión de una sola célula génicamente alterada que le confiere ventajas de mayor supervivencia y de proliferación celular (34,35)

Durante la citodiferenciación embrionaria de la hipófisis, se han identificado diferentes proteínas reguladoras de la transcripción de diversos genes que han sido implicados como elementos clave para la definición de los fenotipos celulares específicos y de la expresión de genes codificadores de hormonas (33). Es muy probable que estos factores jueguen un papel importante en la determinación de la actividad hormonal y en la citodiferenciación de los

adenomas hipofisarios (33,36). Las mutaciones inactivadoras de estos factores de transcripción, se han asociado con diversos síndromes de hipofunción hipofisaria (37). A la fecha, no se han encontrado mutaciones activadoras de estos factores de transcripción, capaces de producir tumores hipofisarios sin embargo la presencia de adenomas que co-secretan diferentes hormonas, sugiere su origen en etapas tempranas de la citodiferenciación.

Todos los sistemas hormonales están regulados por mecanismos de retroalimentación. En la hipófisis anterior, la síntesis y secreción de las distintas células está regulada también por factores hipotalámicos, algunos estimuladores (GHRH, TRH u hormona liberadora de tirotropina, CRH u hormona liberadora de corticotropina, GnRH u hormona liberadora de gonadotropinas) y otros inhibidores (SRIF o somatostatina, dopamina) (3,35). Ciertas evidencias experimentales y clínicas han implicado a la desregulación de estos factores en la generación de tumores endocrinos. Como ejemplo de lo anterior, en ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de la GHRH se induce en secuencia hiperplasia y adenomas del somatotropo (38,39). En un terreno más clínico, la secreción ectópica de CRH y GHRH en humanos, es capaz de producir hiperplasia del corticotropo y somatotropo, respectivamente, con los síndromes clínicos correspondientes (Cushing y Acromegalia) (40). Por otra parte, en el hipotiroidismo primario, la hipotiroxinemia resultante, libera la retroalimentación negativa a la que están sujetas las neuronas productoras de TRH, con la consecuente sobreestimulación del tirotropo hipofisario, detectándose en ocasiones franca hiperplasia del mismo (41).

La formación de tumores endocrinos, incluyendo los adenomas del somatotropo, involucra a una compleja sucesión de eventos en el que seguramente participan fenómenos genómicos y postgenómicos que regulan diferentes vías de señalización celular implicadas en el control de la proliferación celular y apoptosis o muerte celular programada. Así, en el modelo general, una célula génicamente alterada se hace susceptible a la sobreestimulación por factores tróficos, lo que resulta en expansión clonal y producción hormonal autónoma (36). Esta susceptibilidad génica puede estar condicionada por mutaciones activadoras de proto-oncogenes o bien por la inactivación de genes supresores de tumores (35)

Se ha sugerido que la acromegalia pueda ser el resultado de mutaciones activadoras del receptor de GHRH (GHRHR), en analogía con lo que ocurre con otros receptores de la misma familia, como el receptor de TSH en el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

adenoma tiroideo tóxico (42) y los receptores de LH y FSH en tumores hiperfuncionantes de ovario y testículo (43). Esta posibilidad ha sido explorada y se han descrito más de 10 cambios puntuales, considerados a la fecha como polimorfismos, de los cuales sólo uno (M422T, en el extremo carboxilo) parece ser capaz de producir AMPc en forma constitutiva (44,45). Aunque este polimorfismo no parece explicar por sí solo, la oncogénesis en acromegalia, nuestro grupo ha encontrado que es muy prevalente (54%) en la población acromegálica mexicana (46).

En ocasiones, la acromegalia ocurre en forma familiar, ya sea dentro o fuera del contexto de la llamada neoplasia endócrina múltiple tipo I (NEM I). La NEM I consiste de la coexistencia de tumores paratiroides, del páncreas endocrino y de la hipófisis que se hereda en forma autosómica dominante (47). Los tumores hipofisarios más comunes en éste escenario son los productores de prolactina y GH (48-50). El gen responsable de la NEM I ha sido recientemente caracterizado y se localiza en el locus 11q13 (47). Este gen codifica una proteína de 610 aminoácidos de localización nuclear, llamada "menina" que participa como un importante regulador del ciclo celular (47,48). De manera que el gen de la menina es un gen supresor de tumores (48). No se han encontrado mutaciones del gen de la menina en ningún caso de acromegalia esporádica o familiar aislada (49,51). En la acromegalia familiar aislada, sin embargo, parece haber pérdida de la heterocigocidad de 11q13 en el 20% de los casos, lo que sugiere que otro gen supresor de tumores, cercano a éste locus, está alterado (50,51).

El gen supresor de tumores p53 codifica una proteína indispensable para la progresión del ciclo celular (52). Se han encontrado mutaciones inactivadoras de éste gen en varios tipos de cáncer invasor aunque su participación en la formación de tumores hipofisarios es limitada (53). El GADD45 γ es un gen que codifica una proteína de reparación del DNA, está regulado por p53 que también participa en la regulación del ciclo celular y la apoptosis (54). Recientemente, se ha descrito que los niveles de RNAm de GADD45 γ están francamente disminuidos en todos los tipos de tumores hipofisarios, incluyendo 6 de 8 somatotropinomas (54). Los PTTG (gen transformador de tumor hipofisario) son genes que inducen la transformación neoplásica de la hipófisis in vitro (55). Se han descrito 5 PTTGs y se encuentran en íntima relación con el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) y los estrógenos (17,39). Normalmente, estos genes sólo se expresan en tejido testicular, pero se encuentran sobreexpresados en tumores hipofisarios de toda estirpe (56).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las proteínas G son una gran familia de polipéptidos que se encuentran asociados a la cara citosólica de los receptores de superficie que poseen siete hélices α transmembrana (57). Las proteínas G se llaman así, debido a su capacidad de unir nucleótidos de guanina y frecuentemente se les denominan proteínas G heterotrímicas para distinguirlas de otras proteínas que unen nucleótidos de guanina, como la proteína Ras (58). Se han identificado más de mil de estos receptores, entre los que se incluyen los receptores de neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas peptídicas y un gran número de receptores responsables de las funciones del olfato, vista y gusto (59).

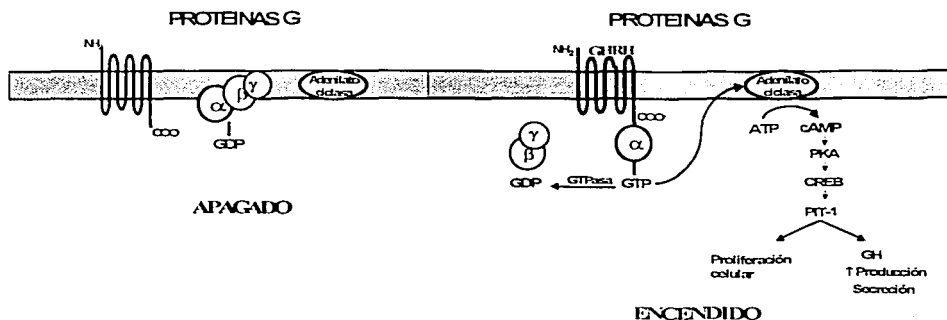
Estructuralmente, las proteínas G están formadas por 3 subunidades proteicas no idénticas α , β y γ , cada una de estas subunidades se encuentran codificadas por genes diferentes. En estado inactivo, α se une a GDP (guanosin difosfato) y forman un complejo trimérico con $\beta\gamma$ (60). Cuando el receptor es activado por su ligando, se produce un cambio conformacional que activa a la proteína G, la subunidad α se asocia GTP (guanosin trifosfato) en lugar de GDP (58-60). La subunidad α unida a GTP, se disocia de β y γ , que permanecen unidas constituyendo un complejo $\beta\gamma$. Tanto la subunidad α unida a GTP activa como el complejo $\beta\gamma$, interaccionan con enzimas efectoras para dar lugar a una respuesta intracelular. $G_{s\alpha}$ estimula a la adenilato ciclasa y cataliza la síntesis de AMPc. El AMPc activa a la proteína quinasa A y produce la transcripción de genes diana específicos relacionados con la proliferación celular y la acción hormonal. En pocos segundos la subunidad α se inactiva por hidrólisis del GTP unido a ella, de tal manera que la subunidad α se reasocia con el complejo $\beta\gamma$ y recupera su estado inactivo, quedando así listo para el comienzo de un nuevo ciclo (figuras 1 y 2) (59,60).

De acuerdo a su homología en secuencia y función de la subunidad α , las proteínas G se dividen en 4 subfamilias $G_{s\alpha}$, $G_{i\alpha}$, $G_{q\alpha}$ y $G_{i2\alpha}$ (59-61). Mediante mutagénesis y transfección in vitro se ha observado que dos proteínas G tienen potencial mitogénico, $G_{s\alpha}$ que activa adenilato ciclasa y $G_{i2\alpha}$ la cual inhibe adenilato ciclasa, modula canales iónicos e interacciona con la vía MAP quinasa (62).

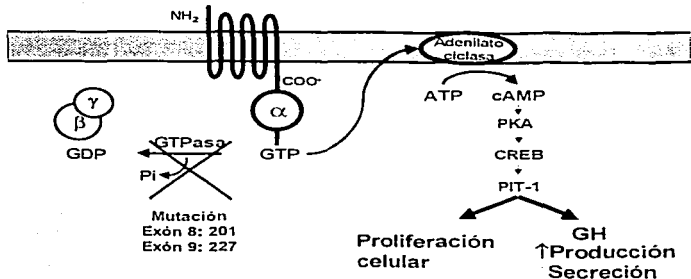
La proteína $G_{s\alpha}$ se encuentra expresada en todas las células excepto en los espermatozoides maduros (63). El gen que codifica a la proteína $G_{s\alpha}$ (GNAS1) se localiza en el cromosoma 20q13 su tamaño es de aproximadamente 20 Kb y está compuesto por 13 exones y 12 intrones, (63,64)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figuras 1 y 2



ONCOGEN GSP α EN ACROMEGALIA



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Las mutaciones activadoras del gen $Gs\alpha$ resultan de cambios puntuales de nucleótidos que se producen en forma heterocigota. Estas mutaciones se encuentran localizadas en dos puntos críticos del gen relacionado con la actividad guanosin trifosfatasa (GTPasa) El cambio en los aminoácidos 201(exón 8, Arg→Cis o His) y 227 (exón 9, Gln→Arg o Leu) produce la abolición de la actividad de GTPasa intrínseca que posee normalmente la subunidad α (46) Estas mutaciones producen por consiguiente una actividad estimuladora persistente de la adenilato ciclasa con una mayor generación de AMPe y una mayor actividad mitogénica (65) Las mutaciones $gs\alpha$ se han encontrado en muchos tumores principalmente en los adenomas hipofisarios secretores de GH y en adenomas tiroideos tóxicos (65,66). Dado su potencial oncogénico, a estas mutaciones se les denomina oncogen gsp (66)

La prevalencia de estas mutaciones en los pacientes acromegálicos tiene una variabilidad étnica y geográfica. Se ha encontrado hasta en un 40% en las poblaciones caucásicas (67), son poco frecuentes en los acromegálicos japoneses (4 a 9%) (68,69) mientras que investigadores coreanos las han encontrado hasta en un 43% (70)

Varios estudios han tratado de establecer una correlación entre la presencia de la mutación del gen $Gs\alpha$ y las características clínicas, bioquímicas y fenotípicas de la acromegalia, sin embargo los resultados han sido heterogéneos (71). Muchos estudios in vivo e in vitro, han demostrado que los pacientes cuyos tumores tienen la mutación del gen $Gs\alpha$, presentan una mayor expresión de los receptores a somatostatina con una mejor respuesta a la acción inhibitoria de los análogos de la somatostatina en términos de la síntesis de AMPe y la proliferación celular (72-74) Se ha sugerido que los tumores con la mutación Gsp, con persistencia de la actividad tumoral, pueden ser candidatos al tratamiento médico con análogos de la somatostatina (71).

El gen $GNAS1$ es uno de los aproximadamente 200 genes humanos sujetos a impronta genómica o metilación del DNA ("imprinting") (63). Este fenómeno de impronta consiste en el silenciamiento transcripcional que ocurre durante la embriogénesis de uno de los alelos parentales mediante la metilación de las llamadas islas de CpG en la región promotora del gen en cuestión (75). El resultado final de éste fenómeno, es que de manera tejido específica, sólo uno de los 2 alelos, el materno o el paterno, quedan expresados (63,75). Estudios en animales y en humanos, han demostrado que $Gs\alpha$ está improntado de una

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

manera tejido específica, expresándose variablemente, del alelo materno en algunos tejidos y bialélicamente en otros. Estos datos han permitido comprender mejor la variabilidad fenotípica de las mutaciones $Gs\alpha$ con pérdida de función en entidades como la osteodistrofia hereditaria de Albright (AHO), el pseudohipoparatiroidismo IA y IB y el pseudopseudohipoparatiroidismo (75-77). En el tejido hipofisario normal, $Gs\alpha$ está improntado y expresado monoalélicamente del alelo materno (63). De manera que para que una mutación de $Gs\alpha$ sea capaz de generar el fenotipo acromegálico, ésta debe ocurrir en el alelo materno (63,75). Lo anterior fue recientemente comprobado en un estudio de 22 somatotropinomas con mutación $Gs\alpha$, de los cuales 21 tenían mutado el alelo materno (78).

SINDROME DE McCUNE-ALBRIGHT (MAS)

El MAS es una enfermedad caracterizada por displasia fibrosa poliostótica, manchas café con leche, pubertad precoz e hiperfunción de múltiples glándulas endocrinas (79). Esta enfermedad es el resultado de una mutación somática activadora del gen que codifica a la subunidad alfa de la proteína Gs (GNAS1) que se adquiere en forma esporádica durante la vida embrionaria (66,80). La adquisición de esta mutación en etapas tempranas de la vida produce una distribución más generalizada del mosaicismo y afecta a los tejidos que expresan receptores asociados a proteínas G (81). En los pacientes con el MAS la proporción de células afectadas por esta mutación varía de tejido a tejido esto da como resultado las manifestaciones clínicas características (80,81).

En todos los tejidos afectados de los pacientes con MAS se ha encontrado la mutación en el dominio de la GTPasa del gen, en el codón 201 (exón 8, Arg→Cis o His) (80,81). Como se mencionó anteriormente esta mutación tiene la capacidad de originar proliferación celular e hiperfunción por incremento de señales mitogénicas mediadas por AMPc así estos pacientes presentan adenomas hiperfuncionantes de tiroides, adenomas hipofisarios productores de GH y tumores hiperfuncionantes de células de Leydig (80-81). También frecuentemente se asocia a displasia fibrosa poliostótica caracterizada por tubulopatía renal proximal, fosfatúria, aminoaciduria, proteinuria e inhibición adrenal de la 1α hidroxilasa renal. Otras asociaciones poco frecuentes, incluyen el compromiso hepático, cardíaco, muscular y de otros tejidos (81).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En un estudio multicéntrico, analizan el comportamiento clínico de la acromegalia en 58 pacientes con MAS (82). En esta serie, solo en 12 pacientes (21%) se demostró acromegalia clínica y bioquímica. Los pacientes con pubertad precoz y exceso de GH lograron una estatura normal debido al sierr epifisario temprano. En 11 de los 12 pacientes se encontró hiperprolactinemia. La resonancia magnética demostró adenoma hipofisario solo en 4 de los 12 pacientes (33%). En ninguno de los casos el adenoma fue mayor de 2.5 cm de diámetro. En cuanto al tratamiento médico se observó una mejor respuesta a la aplicación de análogos de somatostatina de larga acción (82).

II .-JUSTIFICACION

- Si bien el descubrimiento del oncogen gsp abrió una perspectiva en el estudio de la oncogénesis de los tumores hipofisarios, la variabilidad en su prevalencia de acuerdo al origen étnico de las poblaciones estudiadas ha llamado la atención. La presencia de estas mutaciones en poblaciones como la nuestra, que en su mayoría es mestiza, resulta interesante desde el punto de vista génico y fisiopatológico. Algunos investigadores han propuesto que las poblaciones orientales (china y japonesa) y la población americana (poblaciones indígena, mestiza de México y nativo-americanos) probablemente compartan ancestros genéticos comunes. Así, algunas enfermedades como el síndrome de Behcet's y la parálisis periódica tirotóxica son particularmente frecuentes en estos dos grupos étnicos y considerablemente raras en las poblaciones blanca-caucásica y negra. (83,84)
- La justificación práctica del presente estudio tiene que ver con la asociación de la mutación con el pronóstico del paciente acromegálico. Como se mencionó con anterioridad, la tasa de curación no va más allá del 75%. Los factores clínicos que se relacionan con la tasa de curación son principalmente los niveles basales de GH y el tamaño del tumor. Hay pocos estudios que analizan la asociación de la presencia de la mutación con la tasa de curación.

TESIS CON
SELLA DE ORIGEN

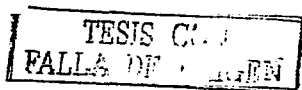
III.- OBJETIVOS

1. Investigar la prevalencia de las mutaciones del gen de la proteína G α en pacientes acromegálicos mexicanos.
2. Investigar la asociación entre la presencia de la mutación del gen de la proteína G α con:
 - El tamaño del tumor
 - Niveles de GH
 - Criterios de curación

IV -HIPOTESIS

1.- Los adenomas con la mutación del gen de la proteína G α se asocia con:

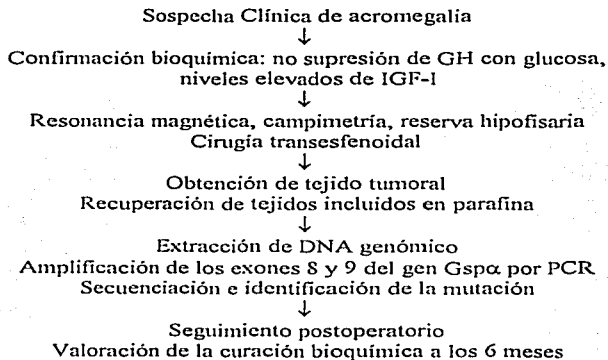
- Adenomas menores de 10 mm de diámetro
- Niveles de GH inferiores a 10 ng/dL
- A una mejor tasa de curación.



V.- MATERIAL Y METODOS

Se incluyeron 58 sujetos con diagnóstico de acromegalia, de cualquier edad y sexo que recibieron su tratamiento quirúrgico en el Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional. Para la realización del estudio, se obtuvo la aprobación del comité de ética la Institución así como la autorización escrita de los pacientes para el estudio molecular de su tumor

DISEÑO DEL ESTUDIO:



CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Individuos de cualquier edad y sexo con diagnóstico de acromegalia.
- Sin contraindicación para el tratamiento quirúrgico
- Consentimiento escrito para el estudio
- Pacientes operados de adenoma secretor de GH en los últimos 5 años que continúan su control en la Institución.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN.

- Tratamiento previo con radioterapia

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Muestra insuficiente del tumor.

CALCULO DE LA N:

El número de la muestra para encontrar la prevalencia de la mutación del gen $Gs\alpha$ se obtuvo en base al estudio piloto de 12 muestras. Se encontró una incidencia del 33% comparada con el 40 y 4 % en otras series publicadas. Se obtuvo un valor delta de 24% con un poder de la prueba de $1-\beta = 90\%$ y $1-\alpha = 0.05\%$. Se estimó una n de 61.

METODOS

El diagnóstico de acromegalia se realizó mediante la falta de supresión de GH después de una carga oral de 75 g de glucosa (normal <1 ng/mL), así como niveles elevados de IGF-I, ajustados para edad y sexo. La GH se procesó mediante un ensayo enzimático quimioluminiscente de dos sitios en fase sólida, con un límite de detección de 0.01 ng/ml y un coeficiente de variación inter e intraensayo de 6%. Fue procesado en un analizador automático (IMMULITE; Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA) y los resultados se encuentran expresados en ng/ml. La IGF-I fue separada de sus proteínas transportadoras mediante el método de extracción ácido-etanol y los niveles de IGF-I fueron determinados por un método inmunoradiométrico de dos sitios (Diagnostic Systems Laboratory, Webster, TX) con coeficiente de variación intra e interensayo de 2.6 y 4.4% respectivamente.

De acuerdo a los niveles de GH basal, los pacientes fueron divididos en dos grupos. Pacientes con concentraciones basales de GH mayores o iguales de 10 ng/mL y menores de 10 ng/mL.

TRABAJO DE
FALLA DE CARGA

A todos los pacientes se les realizó resonancia magnética nuclear y campimetría computarizada para valorar las alteraciones estructurales ocasionadas por compresión quiasmática. Además, se evaluaron las hormonas hipofisarias para conocer la reserva hipofisaria y las deficiencias hormonales asociadas para lograr una adecuada sustitución. El diámetro mayor del tumor fue medido en milímetros. De acuerdo al tamaño, fueron divididos en dos grupos, pacientes con tumor mayor o igual de 10 mm (macroadenomas) y menor de 10 mm (microadenomas).

Durante el tratamiento quirúrgico se obtuvieron muestras del tumor en 37 sujetos, los especímenes fueron congelados a -70°C hasta el momento de su procesamiento. El diagnóstico de adenoma productor de GH fue confirmado mediante estudio histopatológico e inmunohistoquímico en una porción del tejido.

Seis meses después del tratamiento quirúrgico se valoró curación bioquímica. Se consideró curado a todo paciente capaz de suprimir sus niveles de GH <1 ng/mL después de la administración de una carga de glucosa y niveles normales de IGF-1 (25).

Se incluyeron 21 especímenes de tumores incluidos en parafina conservados en el Servicio de Patología de sujetos acromegálicos sometidos a cirugía transfenoidal en los últimos 5 años que continúan su seguimiento en este Hospital.

EXTRACCIÓN DE DNA GENOMICO DE TEJIDOS CONGELADOS.

El DNA genómico fue extraído del tejido previamente descongelado mediante técnicas estandarizadas (85). Se pesaron 25 mg de la muestra, se colocó en un microtubo de 2 ml, se añadieron 200 μl de buffer de digestión de tejidos (50 mM de Tris.HCl PH 8.5, 1 mmol/L de EDTA, 0.5% de Tween 20) y 0.2 mg/mL de proteinasa K; se mezcló por agitación y se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, previa agitación manual de la muestra, se incubó a 95°C durante 8 minutos para degradar la proteinasa K. Posteriormente se agregaron a la muestra 140 μl de fenol y el mismo volumen de cloroformo (alcohol isoamílico 24:1), se agitó y luego se centrifugó a 14000 rpm durante 15". Posteriormente se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo estéril. Se adicionaron 25 μl de amonio 3.0 M y 2.5 volúmenes de alcohol absoluto a 4°C y la muestra fue centrifugada a 15000 rpm durante 15". El sobrenadante fue recolectado en un tubo estéril y se adicionaron 2.5

volúmenes de etanol absoluto a 4°C para precipitar el DNA. El DNA precipitado se recolectó con una pipeta Pasteur estéril de punta curva y se lavó con etanol frío al 70%. Por último, la muestra se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 200 µl de agua bidestilada estéril. El DNA se conservó a -20°C hasta su análisis posterior.

EXTRACCIÓN DE DNA DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA.

La extracción del DNA genómico de los tejidos incluidos en parafina fue extraído mediante técnicas estandarizadas (86,87). Se obtuvieron 6 cortes de cada bloque de parafina de 5 µm de grosor, previamente fue examinado con microscopio de luz para diseccionar el tumor del tejido hipofisario normal y remover exceso de parafina adyacente. El tejido se colocó en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml., para la remoción de la parafina se añadió 1 ml de Xileno y se incubó a temperatura ambiente durante 30'. El tejido fue centrifugado durante 5' a 15000 rpm y el sobrenadante descartado. La muestra de tejido fue lavada con etanol absoluto 3 veces. Posteriormente, el tejido fue tratado con proteinasa K de la misma manera que en el procedimiento anterior. Después de la desnaturalización térmica de la proteinasa K, la muestra fue centrifugada y el sobrenadante que contiene el DNA fue conservado a -20° hasta su análisis .

Para determinar la calidad del DNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio al 0.0002%; se comparó el PM con un marcador estándar (ϕ X 174 RF DNA/Hae III fragments, GIBCO BRL) La concentración del DNA obtenido, se determinó mediante la técnica semicuantitativa comparativa con el marcador Low DNA Mass Ladder GIBCO BRL.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Por medio de la técnica de PCR se amplificaron los exones 8 y 9 del gen del la subunidad α de la proteína G. De los tejidos frescos, se amplificaron ambos exones juntos y de los tejidos incluidos en parafina cada exón fue amplificado por separado. Los oligonucleótidos (primers) fueron adquiridos en una casa comercial (Accesolab México) y llevados a una concentración final de 100 µM. Los pares de oligonucleótidos utilizados, así como las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 3. En todos los casos se preparó una reacción estándar final de 50 µl de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook y col. (87). Cada reacción contenía 100 a 500 ng de DNA buffer de amplificación

10X (Tris-HCl/KCl/Mg₂) a una concentración final de 1X, mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP's) a una concentración final de 20µM, los oligonucleótidos a concentraciones específicas finales (30 pmol), y taq polimerasa 2.5 U (Gibco BRL) y ddH₂O estéril. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un equipo Gene Amp PCR System 2400 de Perkin Elmer.

TABLA 3 Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de los exones 8 y 9 del gen de la subunidad alfa de la proteína G.

Exón	Oligonucleótidos (5' - 3')	Producto amplificado	Temperatura y tiempo de alineamiento
8 y 9	5'GTGATCAAGCAGGCTGACTATGTG3' 5'GCTGCTGGCCACCACGAAGATGAT3'	526 pb	65°C (2 min)
8	5'GATTGGCAATTATTACTGTTTC3' 5'AGGAGGACAGCTGGTTATTCCA3'	226 pb	52°C (2 min)
9	5'TGGAATAACCAGCTGTCTCCTCC3' 5'GCTGCTGGCCACCACGAAGATGAT3'	218 pb	68°C (2 min)

Los productos finales de cada reacción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio al 0.0002%. En cada caso se incluyó un marcador de peso molecular, una muestra control de un tumor sin la mutación como control positivo y una reacción a la cual no se le agregó DNA, como control negativo.

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE LA EXTRACCIÓN EN GEL DE AGAROSA.

Cada uno de los productos de PCR fue extraído del gel de agarosa al 2% mediante la técnica de purificación de adsorción (QIAquick Gel Kit QIAGEN). Se cortó la banda del gel con el producto de amplificación, se pesó y se disolvió en una solución de TBE modificado, se dejó atravesar en el tubo filtro que contienen una membrana de sílica-gel donde queda atrapado el DNA debido a la alta concentración en sales y a su pH. La elusión se realizó con 50 µl del buffer pH < 7.5, donde quedó resuspendido el producto final de PCR.

El DNA de los productos purificados se cuantificó mediante la técnica semicuantitativa comparativa con el marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Gibco BRL)

SECUENCIACION DIRECTA DE LA CADENA SENCILLA DEL PRODUCTO.

La secuenciación de los exones 8 y 9 de la subunidad alfa de la proteína G se realizó con un estuche comercial (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit. Perkin-Elmer Corp, Branchburg New Jersey, USA). El procedimiento se basó en el método descrito por Sanger y cols. (88), para la formación de moléculas de diferente tamaño con dinucleótidos marcados con fluorógenos. Después de finalizar la PCR, se procedió a la purificación de los productos mediante columnas de purificación (QIAquick Kit QIAGEN). Las muestras (1.5µl /carril) fueron analizadas en un secuenciador automático ABI PRISM 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizaron pruebas estadísticas descriptivas. La asociación de la presencia de la mutación con la tasa de curación, el tamaño del tumor y los niveles de GH se realizó mediante la prueba de Chi cuadrada y la prueba exacta de Fisher. El valor de P menor de 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

VIII.- RESULTADOS.

Fueron incluidos en el estudio 58 sujetos con diagnóstico clínico y bioquímico de acromegalia. En 11 de los 58 tumores se encontró la mutación del gen de la proteína G α que correspondió al 19% de los casos. La mutación en el exón 8, se encontró en el aminoácido 201 (Figura 3). En 8 de los adenomas la mutación fue un cambio puntual de CGT→TGT (Arg→Cis) y en 3 CGT→CAT (Arg→His).(tabla 4) No se encontraron mutaciones en el exón 9.

La tabla 5 resume las características clínicas de los pacientes con y sin la mutación del gen de la proteína G α . La edad promedio de los pacientes sin la mutación fue de 38.6 \pm 8 y con la mutación fue de 37.7 \pm 6. En el grupo de pacientes con la mutación del gen de la proteína G α , la proporción de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hombres y mujeres fue prácticamente la misma, mientras que el sexo femenino predominó en los casos sin mutación .

Los tumores de los pacientes con mutación tendieron a ser microadenomas con mayor frecuencia que en los pacientes sin mutación (27% vs. 8.5%, $p=0.075$) . La severidad de la acromegalia fue juzgada con base en los niveles preoperatorios de GH y de IGF-I. Los niveles promedio de GH preoperatoria fueron discretamente menores en los pacientes con mutación que en aquellos sin la alteración molecular, aunque esto no alcanzó significancia estadística (15.5 ± 11.4 ng/mL vs 21.8 ± 13.4 ng/mL, $p=0.433$). Cabe resaltar que en ambos grupos el porcentaje de pacientes con niveles de GH por arriba de 10 ng/mL, fue muy similar (64% vs 75%). Como se mencionó con anterioridad, los niveles de IGF-I son edad y género dependientes, por lo que los valores medidos tienen que ser ajustados. Para esto, nosotros hemos creado un "índice" de IGF-I que resulta del cociente entre el valor medido sobre el límite superior de lo normal (26). El índice de IGF-I fue similar en ambos grupos (con mutación 1.7 ± 0.73 , sin mutación 1.55 ± 0.32). La frecuencia de hipertensión, diabetes e intolerancia a hidratos de carbono, fue la misma en ambos grupos. En cuanto a la tasa de curación después del tratamiento quirúrgico, cumplieron los criterios de curación el 38% de los pacientes sin la mutación y el 45.4% de los pacientes con la mutación. ($P=0.738$) (Tabla 6).

Figura 3: Electroesferogramas con la mutación puntual heterocigota en el codón 221 del exón 8 del gen GSPa: CGT→TGT (Arg→Cis) y CGT→CAT (Arg→Hist)

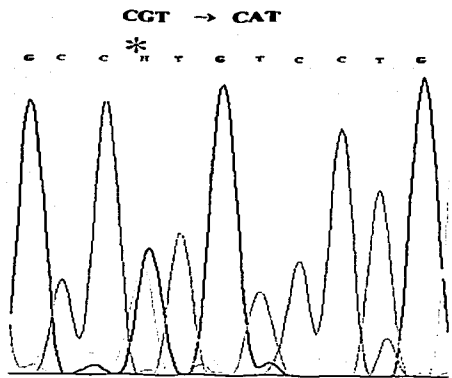
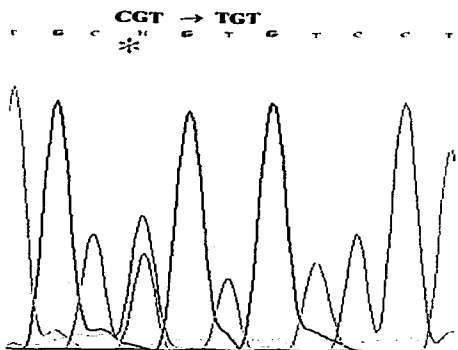


Tabla 4. Mutación gsp en 11 de los 58 tumores

Paciente	Edad	Sexo	Codón	Mutación	aminoácido
1	40	F	201	<u>C</u> GT→ <u>I</u> GT	Arg→Cys
2	30	M	201	<u>C</u> GT→ <u>I</u> GT	Arg→Cys
3	32	F	201	<u>C</u> GT→ <u>I</u> GT	Arg→Cys
4	27	F	201	<u>C</u> GT→ <u>I</u> GT	Arg→Cys
5	33	M	201	<u>C</u> GT→ <u>I</u> GT	Arg→Cys
6	22	M	201	<u>C</u> GT→ <u>I</u> GT	Arg→Cys
7	38	F	201	<u>C</u> GT→ <u>I</u> GT	Arg→Cys
8	57	F	201	<u>C</u> GT→ <u>T</u> GT	Arg→Cys
9	42	M	201	<u>C</u> GT→ <u>C</u> AT	Arg→Hist
10	52	M	201	<u>C</u> GT→ <u>C</u> AT	Arg→Hist
11	33	M	201	<u>C</u> GT→ <u>C</u> AT	Arg→Hist

M: mujer, H: hombre

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5. Características demográficas y clínicas de los 58 pacientes acromegálicos

	<u>SIN MUTACION</u> N:47	<u>CON MUTACION</u> N:11
Edad	38.6±8	37.7±6
Género	17H/30M	6H/5M
GH basal (ng/mL)	21.8±13.4	15.5±11.4
Índice de IGF-I	1.55±0.32	1.72±0.73
Intolerancia a CH	36%	32%
Diabetes mellitus	18%	21%
% macroadenomas	91%	73%
Curación bioquímica	38%	45%

Tabla 6. Análisis estadístico de los 58 pacientes acromegálicos

	<u>SIN MUTACION</u> N:47	<u>CON MUTACION</u> N: 11	<u>P *</u>
Con criterio curación	18 (38%)	5 (45.4%)	P=0.738
Sin criterio curación	29 (62%)	6 (54.5%)	
Tumor \geq 10 mm	43 (91%)	8 (72.7%)	P=0.075
Tumor < 10 mm	4 (8.5%)	3 (27.2%)	
GH \geq 10 ng/mL	35(74.4%)	7 (63.6%)	P=0.433
GH < 10 ng/mL	12 (25.5%)	4 (36.4%)	

*Con mutación Vs sin mutación por Chi cuadrada y exacta de Fisher

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX.- DISCUSION.

Los estudios realizados en los últimos años nos han proporcionado importantes progresos para el entendimiento de la patogénesis de los tumores hipofisarios (34,35). El descubrimiento del oncogen *gsp* en los tumores productores de GH, y en los tejidos afectados del síndrome de McCune Albright representa uno de los avances más importantes en la investigación del efecto biológico de estas mutaciones (63,81,89).

En la acromegalia, los adenomas que presentan la mutación del gen *Gsα* produce una activación constitutiva del receptor de la GHRH. El cambio de un nucleótido del gen *Gsα* en los codones 201 y 227 produce la sustitución de un aminoácido que ocasiona la pérdida de la función GTP-asa que tiene esta subunidad. De esta manera, no se produce la hidrólisis de GTP a GDP dando una permanente actividad de la adenilato ciclasa con la producción de AMPc (90)

La presentación de esta mutación en etapas tempranas de la vida durante la embriogénesis origina el Síndrome de McCune Albright. El mosaicismo somático se refleja por la identificación de células mutadas y normales en los tejidos que expresan receptores asociados a proteínas Gs. El síndrome de McCune Albright se caracteriza por la tríada clásica de displasia fibrosa poliostótica, manchas café con leche en la piel e hiperfunción endocrina (hipofisaria, gonadal, tiroidea) (79). La presentación fenotípica de esta enfermedad, es el resultado de la respuesta celular de la activación de la vía de la traducción de señal de la adenilato ciclasa con la consiguiente producción de AMPc. (80). Esta misma mutación puede ocurrir en forma esporádica en etapas más tardías, afectando principalmente a la glándula hipófisis y tiroides. Así se ha encontrado hasta en un 40 % en los adenomas productores de GH y hasta el 30% en los adenomas tiroideos hiperfuncionantes (59,65)

En el presente trabajo, hemos investigado la prevalencia de la mutación del gen *gα* en los adenomas de pacientes acromegálicos que recibieron tratamiento quirúrgico de su tumor. De los 58 tumores incluidos se ha encontrado esta mutación en 11 que corresponde al 19%. Si analizamos los reportes previos (Tabla 6), se puede observar que la prevalencia de esta mutación presenta una variabilidad étnica y geográfica. Es probable que existan factores ambientales y/o raciales que no han sido identificados hasta la actualidad que pueden contribuir en su presentación en las distintas regiones

del mundo. Este mismo comportamiento se ha descrito que presentan otras mutaciones oncogénicas como la mutación *ret* (91). En las poblaciones caucásicas, la prevalencia del oncogen *gsp* se ha encontrado hasta en el 40% en cambio en las poblaciones orientales la prevalencia es baja, entre 4 al 9%. En este estudio la prevalencia es del 19%, podría considerarse que es intermedia entre la población caucásica y oriental. Algunos investigadores han propuesto que las poblaciones orientales (china y japonesa) y la población americana (indígena, mestiza y nativo americana) probablemente compartan ancestros comunes. Así, existen reportes previos de enfermedades como el síndrome de Behcet's y la parálisis periódica tirotóxica que son particularmente más frecuentes en estos dos grupos étnicos (83,84)

Los conocimientos disponibles sobre el pronóstico clínico de la acromegalia se basan en estudios clínicos y quirúrgicos. En estudios previos, se ha demostrado que los tumores grandes (macroadenomas) que se acompañan de concentraciones basales elevadas de GH tienen un comportamiento más agresivo y tienen un peor pronóstico. (19,23,24) En algunos estudios se ha tratado de establecer la relación de la presencia del oncogen *gsp* con las características fenotípicas de la enfermedad. Como se observa en la tabla 4, los resultados han sido muy heterogéneos. En nuestro estudio la edad promedio de los pacientes con la mutación fue de 38.6 ± 8 Vs 37.7 ± 6 sin la mutación. Existe un reporte en el que encuentran una mayor predisposición en pacientes de mayor edad (49) , este dato no ha sido consistente en otros estudios.

En relación con el tamaño del tumor, en muchos estudios se ha encontrado que los tumores con la mutación frecuentemente son microadenomas, y podrían presentar una mejor tasa de curación (19,71), En nuestro estudio el 27% de los tumores con la mutación fueron microadenomas comparado con el 8.5% de los que no tienen la mutación, la diferencia no es significativa ($P=0.075$).

En el Síndrome de McCune Albright con acromegalia, en la mayoría de los pacientes no presentan tumor, y solo en un 33% se asocia a tumores menores de 2.5 cm de diámetro (82).

La severidad de la acromegalia se ha asociado también a las concentraciones basales elevadas de GH. Algunos estudios han encontrado concentraciones mas bajas de GH en los pacientes con la mutación *gsp* (92). En nuestros pacientes las concentraciones promedio de GH en los pacientes con la mutación fueron discretamente menores en los pacientes con la mutación comparado con los pacientes sin la alteración molecular, aunque no alcanzó significancia estadística (15.5 ± 11.4 ng/mL vs 21.8 ± 13.4 ng/mL, $p=0.433$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 7: Mutación Gsp α y características clínicas de tumores secretores de GH reportados en la literatura.

ESTUDIO	Gsp+ %	Ex8/Ex9	TAMAÑO TUMORAL		GH basal (ng/ml)	
			GSP+	GSP-	GSP+	GSP-
Spada, 1990 N=80 (74)	36%	?	36% mic 53% ES	16% mic 36%ES	43.5 \pm 35	32.1 \pm 33
Landis, 1990 N=25 (91)	43%	9/1	15 \pm 6 mm	24 \pm 10mm	17 \pm 10	8.4 \pm 11.2
Harris, 1992 N=26 (99)	35%	9/0	17 \pm 7 mm	20 \pm 9 mm	44.7 \pm 47	41.4 \pm 43.5
Adams, 1993, N=19 (72)	42%	7/1	ND	ND	30.8 \pm 22.3	88.6 \pm 77
Hosoi, 1993, N=45 (68)	4.4%	2/0	ND	ND	ND	ND
Yashimoto, 1993 N=53 (69)	9%	4/0	ND	ND	ND	ND
Yang, 1996, N=21 (70)	43%	9/0	11.4 \pm 5mm	17 \pm 8.3mm	53.5 \pm 76	65 \pm 73
Barlier, 1998, N=30 (73)	27%	8/0	16 \pm 1.6mmN	21 \pm 2.1mm	59 \pm 23.2	41 \pm 9.1
Mendoza, 2002, N=58	19%	11/0	27% mic	8.5% mic	15.5 \pm 11.4	21.8 \pm 13.4

Mic: microadenoma, ES: extensión extraselar, ND: no descrito

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X.-BIBLIOGRAFÍA

1. Melmed S, Casanueva F. Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinol Metabol Clin North Am* 1992;21(3):483-518
2. Cuttler L. The regulation of growth hormone secretion. *Endocrinol Metabol Clin North Am* 1996;25 (3): 541-71
3. Bauman G. Growth Hormone and its disorders. In Becker KL(Ed)Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp 129-45
4. Mercado M, Davila N, McLeod JF, Bauman G. Distribution of growth hormone receptor messenger ribonucleic acid containing and lacking exon 3 in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:731-35
5. Melmed S. Acromegaly *N Engl J Med* 1990;322:966-977
6. Molitch ME Clinical Manifestations of Acromegaly . *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992;21(3):597-614
7. Etxabe J, Gaztambide P, Latorre P et al. Acromegaly : An epidemiological study. *J Endocrinol Invest* 1993;16:181-189
8. Ezzat S. Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997;26(4):703-23
9. Karaly G, Stover C, Beyer J, et al. Relation of endocrine and cardiac findings in acromegalics. *J Endocrinol Invest* 1992;15:13-18
10. Ezzat S, Melmed S. Are patients with acromegaly at increased risk for neoplasia? *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:245-249
11. Rajasoorya C, Holdaway IM, Wrightson P, Scott DJ & Ibbertson HK. Determinants of clinical outcome and survival in acromegaly. *Clin Endocrinol* 1994;41:95-102
12. Kovacs K, Horvath E. Tumors of Pituitary Gland. Fascicle 21, Second Series. Atlas of Tumor Pathology. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology, 1986
13. Molitch ME. Pathogenesis of pituitary tumors. *Endocrinol Metabolism Clin North Amer* 1987 ;16 :503-527
14. Asa SL, Kovacs K. Pituitary Pathology in acromegaly. *Endocrinol Metabolism Clin North Amer* 1992 ;21 (3): 553-74
15. Acromegaly Caused by Secretion of growth hormone by a Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2000;342:1871-1876
16. Ben-Shlomo A, Melmed S. Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30(3):565-83
17. Melmed S, Ho K, Klibanski A, Reichlin S, Thorer M. Recent Advances in pathogenesis, diagnosis, and management of acromegaly *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3395-402

18. Chapman IM, Hartman ML, Straume M et al. Enhanced sensitivity growth hormone (GH) chemiluminescence assay reveals lower postglucose nadir GH concentrations in men than women. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1312-17
19. Fahlbush R, Honegger J, Buchfelder M. J. Surgical Management of Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992;21(3):669-92
20. Bauman G. Growth hormone heterogeneity: Genes, isohormones, variants and binding proteins. *Endocr Rev* 1991;12:424
21. Barkan AL, Beinits IZ, Kelch RP. Plasma insulin-like growth factor-1/somatomedin C in acromegaly: Correlation with the degree of growth hormone hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:69
22. Grinspoon S, Clemmons D, Swearingen B et al. Serum insulin-like growth factor-binding protein-3 levels in the diagnosis of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:927-31
23. Tindall GT, Oyesiku MN, Watts NB et al. Transsphenoidal adenectomy for growth hormone-secreting pituitary adenomas in acromegaly: outcome analysis and determinants of failure. *J Neurosurg* 1993;78:205-215
24. Davis DH, Lavvs ER, Ilstrup DM. Results of surgical treatment for growth hormone-secreting pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1993;79:70-75
25. Giustina A, Barkan A, Casanueva FF, et al. Criteria for cure of Acromegaly: A Consensus Statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:526-29
26. Espinosa de los Monteros AL, Mercado M, Sosa E et al. Changing patterns of insulin-like growth factor-1 and glucose-suppressed growth hormone levels after pituitary surgery in patients with acromegaly. *J Neurosurg* 2002 ;97:287-92
27. Easman RC, Gorden P, Gltstein E, and Roth J. Radiation Therapy of Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992;21(3):693-712
28. van der Lely AJ, de Herder WW, Lamberts SW. The role of radiotherapy in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3185-6
29. Jackson IM, Noren G. Role of gamma knife radiosurgery in acromegaly. *Pituitary* 1999;2:71-7
30. Jaffe CA, Barkan AL. Treatment of Acromegaly with Dopamine Agonist. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992;21(3):713-735
31. Lanberts SW, vander Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med* 1996;25:246-54
32. Freda PU. Somatostatin analogos in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3013-18

35

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

33. Asa S, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocrine Rev* 1998;19(6):798-827.
34. Hernan V, Kovacs K, Melmed S, Fagin J, Gonsky R. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1427-1433.
35. Heaney AP, Melmed S. New Pituitary Oncogenes. *Endocrine-Related Cancer* 2000;7:3-15.
36. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28(1):1-13.
37. Lloyd RV. Molecular pathology of pituitary adenomas. *J Neurooncol* 2001;54:111-9
38. Thapar K, Kovacs K, Stefanescu L et al. Over expression of GHRH. Fahlbush R, Honegger J, Buchfelder M. J. Surgical Management of Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992;21(3):669-92
39. Billestrup N, Mitchell RL, Vale E Et al: Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6854-57
40. Carey RM, Varma SK, Drake CR, Thorer MO, Kovacs K et al. Ectopic secretion of corticotropin-releasing factor as a cause of Cushing's syndrome. A clinical, morphologic, and biochemical study. *N Eng J Med* 1984;311:13-20
41. Scheithauer BW, Kovacs K, Randall RV, Ryan N. Pituitary gland in hypothyroidism. Histologic and immunocytologic study. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:499-504
42. Kopp P, Muirhead S, Jourdain N, et al. Congenital hyperthyroidism caused by a solitary toxic adenoma harboring a novel somatic mutation (Serin²⁸¹ →Isoleucine) in the extracellular domain of the thyrotropin receptor. *J Clin Invest* 1997;100:1634-39
43. Wu SM, Leschek EW, Brain C, Chan WY. A novel luteinizing hormone receptor mutation in a patient with familial male-limited precocious puberty: effect of the size of a critical amino acid on receptor activity. *Mol Genet Metab* 1999 ;66(1):68-73
44. Adams EF, Symowski H, Buchfelder M, Poyner DR. A polymorphism in the growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) receptor gene is associated with elevated response to GHRH by human pituitary somatotrophinomas in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:33-6
45. Salvatori R, Thakker RV, Lopes MB, Fan X, Eswara JR, Ellison D, Lees P Harding B, Yang I, Levine MA. Absence of mutations in the growth hormone (GH)-releasing hormone receptor gene in GH secreting pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;54(3):301-307

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

46. Sosa E, Mercado M. High permanence of a polymorphism of the GHRH receptor gene in GH-secreting adenomas. Abstrac 209. Young Investigator Meeting. Barcelona, Spain Oct. 2002
47. Teh BT, Kitola S, Farnbo F, et al. Mutation Analysis of the MEN1 Gene in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1, Familial Acromegaly and Familial Isolated Hyperparathyroidism. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:2621-26
48. Prezant T, Levine J, Melmed S. Molecular characterization of the MEN 1 tumor supression gene in sporadic pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:1388-1391.
49. Tanaka C, Kimura T, Yang P, et al. Análisis of Loss Heterozygosity on Chromosome 11 and Infrecuent Inactivation of the MEN 1 Gene in Sporadic Pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:2631-34
50. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. Consensus: Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:5658-71
51. Verges B, Bourcille F, Goudet P ,et al. Pituitary Disease in MEN Type 1 (MEN1): Data from the France-Belgium MEN1 Multicenter Study. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:457-65
52. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 1997;88:323-31
53. Herman V, Drazin NZ, Gonsky R, Melmed S. Molecular screening of pituitary adenomas for gene mutations and rearrangements. J Clin Endocrinol Metab 1993;77:50-5
54. Zhang X, Sun H, Danila DC, et al. Loss of Expression of *CiDD-45γ*, a Growth Inhibitory Gene , in Human Pituitary Adenomas: Implications for Tumorigenesis. J Clin Endocrinol Metab 2002;87: 1262-67
55. Pei L, MelmedS: Isolation and characterization of a pituitary tumor-specific transforming gene. Mol Endocrinol 1997;11:433-41
56. Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, et al. Structure, expression and function of human pituitary tumor transforming gene (PTTG). Mol endocrinol 1999;13: 156-66
57. LambrightG, Noel JP, Hamm HE. Estrucural determinants for activation of the subunit of a heterotrimeric G protein. Nature 1994;369:621-28
58. Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. Mechanism of Disease: The Spectrum of G Protein Diseases. New Engl J Med 1999;340:1012-20
59. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. Endocrine Rev 2000;21(1):90-113.

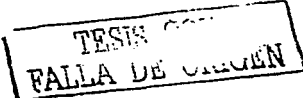
TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

60. Lefkowitz R.J. Clinical implications of Basic Research. G Protein in Medicine. *New Engl J Med* 1995;19:186-188
61. Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. Mechanism of Disease: The Expanding Spectrum of G protein Diseases. *New Engl J Med* 1999;340:1012-20
62. Biesen van T, Luttrell LM, Hawes HA, Lefkowitz R.J. Mitogenic Signaling via G Protein-Coupled Receptors *End Rev* 1996;17:698-714
63. Weinstein LS, Yu S, Warner DR and Liu J. Endocrine Manifestations of Stimulatory G Protein α -Subunit Mutations and the Role of Genomic Imprinting. *End Rev* 2001;22:675-705
64. Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y. Isolation and characterization of the human G α gene. *Proc Natl Acad Sci USA*;85:2081-85
65. Lania A, Mantovani G, Spada A. G Protein mutations in endocrine diseases. *Eur J Endocrinol* 2001;145:543-59
66. Dhanasekaran N, Heasley LE, Johnson GL. G Protein-Coupled Receptor Systems Involved in cell Growth and Oncogenesis. *Endocr Rev* 1995;16:259-70.
67. Harris PE. Gs protein mutation an the pathogenesis and function of pituitary tumor. *Metabolism* 1996;45(suppl 1):120-122.
68. Hosoi E, Yokogoshi Y, Horie H *et al.* Analysis of the gsp alpha gene in growth hormone-secreting pituitary adenomas by the polimerase chain reaction-direct sequencing method using paraffine-embedded tissues. *Acta Endocrinol* 1993;129:301-306.
69. Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Itakura M. Rare mutation of de gsp-alpha subunit gene in human endocrine tumor. *Cancer* 1993;72:1386-1393.
70. Yang I, Park S, Ryu M, et al. Characteristics of gsp-positive growth hormone-secreting pituitary tumors in Korean acromegalic patients. *Eur J Endocrinol* 1996;134:720-726.
71. Faglia G, Arosio M, Spada A. Gs Protein Mutations and Pituitary Tumors: Functional Correlates and Possible Therapeutic Implications. *Metabolism* 1996;45(Suppl 1):117-119
72. Adams EF, Lei T, Buchfelder M et al. Biochemical Characteristics of Human Pituitary Somatotropinomas with and without gsp Mutations: In vitryo Cell Culture Stuiies. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2077-81
73. Barlier A, Gunz G, Zamora A, et al. Pronostic and Therapeutic Consequences of G α Mutations in Somatotrophi Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1604-10
74. Spada A, Arosio M, Bochiello D, et al. Clinical, biochemical and morphological correlates in patients bearing growth hormone secreting

- pituitary tumours with or without constitutively active adenylyl cyclase. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1421-26
75. Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J. Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic imprinting. *Endocr Rev* 2001;22:675-705
 76. Weinstein LS, Chen M, Liu J. G α Mutations and Imprinting Defects in Human Disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002;968:173-197
 77. Spiegel AM. G protein defects in signal transduction. *Horm Res* 2000;53(Sppl 3):17-22
 78. Hayward BE, Barlier A, Korbonits M, et al. Imprinting of the G α gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. *J Clin Invest* 2001;107:R31-R36
 79. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV et al. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 1991;325:1688-95
 80. Ringel MD, Schwindinger WF, Levine MA. Clinical implications of genetic defects in G protein. The molecular basis of McCune-Albright syndrome and Albright hereditary osteodystrophy. *Medicine (Baltimore)* 1996;75:171-184
 81. Levine MA. Clinical implications of genetic defects in G proteins oncogenic mutations in G α as the molecular basis for the McCune-Albright syndrome. *Arch Med Res* 1999;30:522-531
 82. Akintoye SO, Clebli C, Booher S et al. Characterization of gsp-Mediated Growth Hormone Excess in the Context of McCune-Albright Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5104-12
 83. Lavalle C, Alarcon-Segovia D, Del Giudice-Kripping JA, Graga A. Association of Behcet's syndrome with HLA-B5 in the Mexican mestizo population. *J Rheumatol* 1981;8:325-327.
 84. Nellen H, Mercado M, Villanueva S, Mendoza V, Peres M, Hernandez A, Arellano J. Thyrotoxic periodic paralysis in Mexican mestizo patients: A clinical, biochemical and HLA-serological study. *Arch Med Res* 1998;
 85. Buffone GJ, Darlington GJ. Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* 1985;31:164-165
 86. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989 Molecular cloning: a laboratory manual, ed 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989: 14.12
 87. Geer CE, Peterson SL, Kiviat MB, Manos MM. PCR amplification from paraffin embedded tissues. *Am J Clin Pathol* 1991;95:111-124



88. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 1977;74:5463
89. Landis CA, Master SB, Spada A. et al. GTPase inhibiting mutations activate the α chain Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 1989;340:692-696
90. Spada A, Lania A, Ballare E. G protein abnormalities in pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol* 1998;142:1-14
91. Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Medillo R et al. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype *J Clin Invest* 1992;89:1517-22
92. Landis CA, Harsh G, Lyons J et al. Clinical characteristics of acromegalic patients whose pituitary tumors contain mutant Gs protein *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1416-20
93. Buchfelder M, Fahlbush R, Merz T et al. Clinical correlates in acromegalic patients with pituitary tumors expressing GSP oncogenes. *Pituitary* 1999;1:181-5
94. Hahn W C, Weinberg RA. Rules for Making Human Tumor Cells. *N Engl J Med* 2002;347:1593-1603
95. Pfeifer K. Mechanism of genomic imprinting. *Am J Hum Genet* 2000;67:777-87
96. Fruhwald MC, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential. *Mol Genet Metab* 2002;75:1-16
97. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002;196:1-7
98. Fruhwald MC, Plass C. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential. *Mol Genet Metab* 2002;75:1-16
99. Harris PE, Alexander JM, Bikkal HA, et al. Glycoprotein hormone α -subunit production in somatotroph adenomas with and without Gs α mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:918-23



 TESIS GARCIA
 FALLA DE ORIGEN