

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGIA
MANUEL VELASCO SUAREZ

**PREVALENCIA DE MUTACIONES GEMINALES EN EL GEN *AIP* EN ADENOMAS HIPOFISARIOS
FUNCIONANTES Y NO FUNCIONANTES ESPORÁDICOS DE PACIENTES DEL INSTITUTO NACIONAL
DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “ MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA
EN NEUROCIRUGIA**

PRESENTA

DRA. MÓNICA LEM CARRILLO

TUTOR DE TESIS

DRA. LESLY A. PORTOCARRERO ORTIZ

Ciudad de México, Julio 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



DR. PABLO LEON ORTIZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DR. JUAN LUIS GÓMEZ AMADOR

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE NEUROCIRUGÍA

DRA. LESLY A. PORTOCARRERO ORTIZ

TUTOR DE TESIS

Agradecimientos y Dedicatoria.

Gracias a Dios por permitirme vivir la experiencia de la residencia y sobre todo darme la fortaleza y valor de poder seguir adelante cada día.

Gracias a mi familia, mi principal apoyo durante todos estos años. Mis padres, mi hermano Betito, mis abuelitos y mis tías, quienes han contribuido en que yo pueda seguir con mi formación.

Gracias a mi Jefe, el Dr. Juan Luis Gómez Amador, quien me enseñó que para ser un gran neurocirujano no sólo se necesitan conocimiento y habilidad si no también carácter.

Gracias a mi tutora, la Dra. Lesly Portocarrero, quien desde el primer día de la especialidad no dudó en brindarme su apoyo como profesionista y amiga.

Gracias Rodrigo por tu paciencia, apoyo y amor. Estaré eternamente agradecida con el Instituto por formarme como neurocirujano y darme al amor de mi vida.

“La vida es lo que te pasa mientras estas ocupado haciendo planes”; gracias, gracias, gracias. Dedicado a todos ustedes que siempre tendrán un espacio en mi corazón.

Mónica Lem

Índice

1. Resumen Pág. 1
2. Antecedentes Pág. 2
3. *Perspectiva histórica*

Epidemiología

Histopatología

MARCADORES PREDICTIVOS DEL COMPORTAMIENTO DE LOS ADENOMAS HIPOFISIARIOS

Tumorigénesis hipofisaria

Origen genético de adenomas hipofisarios

Gen AIP

Mecanismo de acción

Vía de señalización

Mutaciones del gen AIP

4. Planteamiento del Problema Pág. 11
5. Hipótesis Pág. 11
6. Objetivos Pág. 11
7. Justificación Pág. 12
8. Trascendencia Pág. 12
9. Metodología Pág. 12

Diseño

Población y muestra

Criterios de Selección

Variables analizadas

Análisis Estadístico

Consideraciones Éticas

Aporte financiero

10. Resultados	Pág. 15
11. Discusión	Pág. 23
12. Conclusión	Pág. 25
13. Referencias	Pág. 26

Resumen

Antecedentes: Los adenomas hipofisarios son tumores benignos, constituyen del 10 al 25% de todos los tumores intracraniales primarios, presentan un comportamiento variado desde asintomáticos hasta agresivos e invasores condicionando la presencia de múltiples mutaciones reportadas asociadas con el desarrollo de los mismos, una de ellas es la mutación en el gen IAP, estas se han relacionado con una presentación más temprana habitualmente antes de los 40 años de edad, comportamiento agresivo, mayor riesgo de apoplejía tumoral y menor respuesta a los tratamientos convencionales. Se desconoce la frecuencia de mutaciones en el gen AIP en la población atendida en el INNN, por lo que el conocer la presencia de estas mutaciones nos permitirá disminuir la morbilidad de los pacientes así como evitar posibles complicaciones asociadas a su evolución.

Objetivos: Identificar la frecuencia de las mutaciones en el gen AIP en los diferentes subtipos de adenomas hipofisarios y correlacionar estas mutaciones con el espectro clínico.

Pacientes y métodos: Recolección de forma prospectiva de muestras de sangre periférica en pacientes menores de 40 años del INNN portadores de adenomas hipofisarios. A las muestras se les extrajo ADN para determinar mutaciones en el gen AIP por secuenciación directa. Posteriormente se armó una base de datos con los expedientes electrónicos y físicos de los pacientes, así como variables de laboratorio y estudios de imagen disponibles.

Resultados: Se obtuvieron un total de 100 pacientes con criterios de inclusión de marzo 2017 a febrero 2018, de los cuales 66 fueron candidatos a evaluación de ADN. Fueron hombres en un 50.81% con una media de 27.91 años de edad al momento del diagnóstico con un seguimiento de 202 meses aproximadamente. Los síntomas más frecuentes encontrados como debut fueron afección de agudeza visual en un 49% de los pacientes y apoplejía en 29.78%. Cerca de la mitad de los pacientes (42.97%) ameritaron más de un tipo de tratamiento y un 68.85% se encuentran con criterios de curación y/o control de la enfermedad. Se identificaron 4 muestras (6%) que probablemente cuentan con algún tipo mutación para el gen en cuestión. Por cuestión de reactivos hasta la fecha se han codificado los primero 3 exones y se han obtenido variantes genéticas tanto previamente reportadas como no reportadas.

Conclusión: Las mutaciones asociadas al gen AIP participan en la tumorigénesis de los adenomas hipofisarios. La presencia o no de los polimorfismos encontrados en el gen AIP se ven claramente asociadas a un cambio en el comportamiento de los tumores en pacientes con lesiones adenomatosas en la región selar, presentando repercusiones clínicas severas a menor edad y un control de la enfermedad que conlleva mayor grado de dificultad. Resulta importante identificar los pacientes portadores de la mutación, pues deberá repercutir en una modificación a las decisiones terapéuticas, quirúrgicas y de seguimiento de los mismos, con la finalidad de brindar una mayor calidad de vida a los pacientes.

ANTECEDENTES

Perspectiva histórica

En 1889, Sir Víctor Horsley, fue el primer cirujano en realizar la resección de un adenoma hipofisario vía trans-craneal[1]. El médico italiano, Davide Giordano, desarrollo lo que se convirtió eventualmente en el abordaje trans-esfenoidal para la cirugía de adenoma hipofisario en los inicios del siglo XX[2]; basados en los trabajos de Giordano, Hermann Schloffer, cirujano austriaco, realizo la primera cirugía trans-esfenoidal en 1907[3, 4]. En 1910, Hirsch y Halstead, basados en el trabajo de Schloffer, introdujeron los precursores de los abordajes endonasal y sub labial[5]. El primer abordaje endonasal transepto-esfenoidal completo realizado fue realizado por Oskar Hirsch en 1910[3]. Harvey Cushing estableció un abordaje similar pero diferente utilizando un abordaje trans-nasal submucoso, este mismo medio en 1960, hizo la transición en el tratamiento de los abordajes trans-esfenoidales, a los abordajes trans-craneales debido a la gran influencia en el campo neuroquirúrgico el abordaje trans-esfenoidal fue virtualmente abandonado. Resulta interesante que en sus reportes, el índice de mortalidad entre el abordaje trans-esfenoidal y trans-craneal fue similar, sin embargo aquellos pacientes que fueron tratados con abordaje trans-esfenoidal fueron egresados con mejores condiciones clínicas[3, 4, 6].

En 1965, Guiot fue el primer neurocirujano que uso el endoscopio para la resección de adenoma pituitario, pero dejo de utilizarlo debido a la incapacidad de visualizar estructuras anatómicas claves. El uso del endoscopio fue reintroducido en los inicios de 1990. Janokowski seria el primer neurocirujano en utilizar el abordaje endoscópico endonasal para la resección de adenomas pituitarios[7].

Epidemiología

Los adenomas hipofisarios son tumores benignos, constituyen del 10 al 25% de todos los tumores intracraniales primarios (8), su prevalencia se reporta en 80 casos/100 000 habitantes (9,10,11). Actualmente se ha incrementado debido a los hallazgos en estudios de imagen de mayor resolución, siendo reportada hasta en el 22%, así como en series de necropsias donde se reporta una incidencia de 14.4% de los casos (10).

Pese a que los adenomas hipofisarios son neoplasias benignas el comportamiento de las mismas puede ser agresivo e invasor condicionando la presencia de múltiples comorbilidades, estas pueden ser secundarias al efecto de masa que el tumor produce en el 25% de los casos caracterizado por cefalea, alteraciones visuales, fistula de liquido cefalorraquídeo, convulsiones y/o alteraciones hormonales asociadas, condicionadas por deficiencia o exceso de la producción hormonal; compresión del tallo hipofisario o afección hipotalámica. Habitualmente las alteraciones hormonales se encuentran en el 75% de los casos (11).

Sin embargo más allá de la sintomatología, dichos tumores pueden aumentar la morbi/mortalidad de la población afectada debido al incremento en el riesgo cardiovascular, dada la mayor incidencia de Diabetes Mellitus (DM), Hipertensión Arterial Sistémica (HAS), dislipidemia, disfunción endotelial, entre otros. Todas estas comorbilidades son generadas por el exceso y/o déficit hormonal presente como es el caso de la enfermedad de Cushing, acromegalia o panhipopituitarismo; por lo que estos pacientes presentan un incremento en la mortalidad cardiovascular 2 a 3 veces mayor en comparación con la población general del mismo edad y genero (12).

Los principales tumores hipofisarios son los prolactinomas (40-50%), adenomas hipofisarios no funcionantes (25-27%), adenomas productores de hormona de crecimiento (16-21%), adenomas productores de hormona adenocorticotropa (ACTH) (4.7-16%), adenomas secretores de hormona estimulante de tiroides (TSH) (0.4%) y adenomas secretores de hormona luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH)(0.9%) (13,14).

La incidencia incrementa con la edad, aproximadamente 3.5 – 8.5 de los tumores pituitarios son diagnosticados antes de los 20 años, mientras 30% son diagnosticados entre la tercera decada de vida y la quinta decada de vida como incidentalomas[15].

Los prolactinomas constituye el adenoma pituitario secretor mas comun (35%) le siguen los adenomas pituitarios productores de hormonas sexuales (30-35%), seguidos por los adenomas corticotropicos y somatotropicos (10-15% respectivamente) y los adenomas tirotrpocos (2%)[16].

En una serie de población mexicana, se reportan de un total de 2,240 tumoraciones cerebrales, 480 (21.4%) correspondientes a Adenomas hipofisario, y de los cuales 336 (70%) correspondían a macro-adenomas hipofisarios (MAH) Guinto-Balazar, Lopez-Felix [17]; en cuanto al análisis hormonal se encontraron 75% de las neoplasias como adenomas no funcionantes y 25% funcionantes, mientras que el tamaño promedio al momento del diagnóstico fue de 21.5 mm.

Histopatología

La región selar es el sitio de diferentes entidades patologicas abarcando desde la hipófisis hasta las estructuras anatómicas circunvecinas como el *é*ncéfalo, vasos sanguíneos, nervios craneales y meninges. La patología quirúrgica de esta area requiere una adecuada identificación de las lesiones neoplasicas, incluyendo adenoma y carcinoma hipofisiario, craneofaringeoma, neoplasias neurologicas, tumores de celulas germinales y neoplasias hematologicas, asi como de lesiones no neoplasicas como quistes, hiperplasia y lesiones inflamatorias[16]. Clínicamente los adenomas hipofisiarios se clasifican hormonalmente activos o adenomas funcionales y adenomas no funcionales que comunmente se presentan con alteracion visual e hipotiroidismo, especialmente en hombres. Cerca de dos tercios de los adenomas diagnosticos son funcionales asociados a produccion excesiva de hormonas producidas en la hipófisis[18].

La hipófisis esta compuesta por lo menos de 6 tipos de celulas y cada celula es responsable para la produccion y secrecion de una o mas hormonas especificas. Los recientes avances en la biología molecular han esclarecido la citodiferenciacion de las celulas de la adenohipofisis[16, 19]. Durante el desarrollo embrionario, se realiza una organizada y complejo proceso de diferenciacion celular orquestado por factores de transcripcion especificos (Fig. 1). Estos factores tambien tienen el rol de determinar la citodiferenciacion y produccion hormonal de los adenomas hipofisiarios, su conocimiento puede ayudar a clasificar los adenomas[19].

Las celulas de la adenohipofisis provienen de las celulas madre de la bolsa de Rathke. Las celulas corticotropos son las primeras celulas en diferenciarse en la hipófisis humana fetal[18]. Este proceso es determinado por el factor de transcripcion TPIT[20] que media su accion en compañía de PTX1 y neuroD1[21,22]. La segunda linea de diferenciacion temporal en la glandula humana es mediante PIT-1. Esta proteína tiene una expresion restringida en la hipófisis activando los genes de la hormona de crecimiento, prolactina y fraccion beta de la tirotrófina[23]. PIT-1 inicialmente determina la expresi3n de la hormona de crecimiento y el fenotipo del somatotropo. La expresion del receptor de estrógeno permite la expresion de la prolactina y la hormona del crecimiento en una poblacion bihormonal de mamosomatotropos[24]. El desarrollo de los lactotropos maduros depende de la presencia de la represion putativo de la hormona del crecimiento que aun no es identificado[18]. Algunas de las celulas que expresan PIT-1, posteriormente expresan factor embrionario tirotrópo[25] transformandose en tirotropos con la presencia del represor de la hormona de crecimiento y GATA-2[26]. En estados fisiologicos, somatotropos, mamosomatotropos y lactotropos se transdiferencian de manera reversible[27]. Estos cambios demuestra la fluidez de esta poblacion celular de estos 4 tipos de celulas que son dependientes de PIT-1. La tercera linea de citodiferenciacion es con los gonadotropos los cuales son determinados por el factor - 1 esteroidogenico y GATA-2 en presencia del receptor de estrógeno[26].

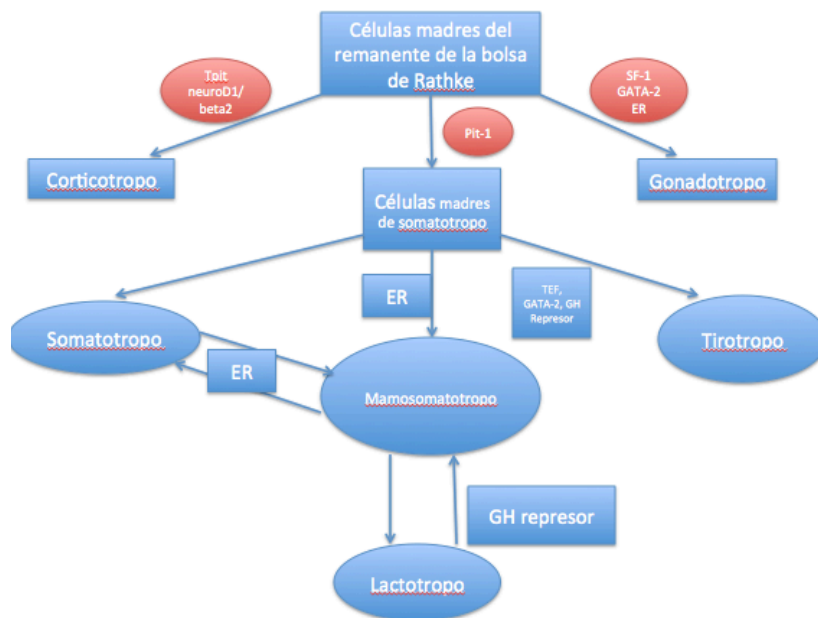


FIGURA 1: DIFERENCIACION CELULAR EN EL DESARROLLO EMBRIANARIO DE LA HIPOFISIS HUMANA.

MARCADORES PREDICTIVOS DEL COMPORTAMIENTO DE LOS ADENOMAS HIPOFISIARIOS

El objetivo principal de los patólogos es proporcionar a los clínicos información útil e importante para predecir el comportamiento biológico del tumor. Diferentes moléculas están involucradas en la progresión tumoral y proliferación celular, así como la citogenética molecular podría servir como marcadores predictivos del comportamiento tumoral. Se dividen en marcadores específicos de células tumorales y elementos estromales específicos involucrando factores vasculares y angiogénicos así como sustancias estromales. Sin embargo, aún con toda la información de la biología tumoral durante las últimas 2 décadas, no se ha establecido un marcador tumoral específico para predecir el comportamiento de los adenomas hipofisarios[28].

Una clasificación morfológica precisa es importante para el manejo clínico y el seguimiento. Por ejemplo, los adenomas somatotropo escasamente granulados, comparados con la variante densamente granulada, son de mayor crecimiento tumoral; presentándose en adultos jóvenes y son más difíciles para reseccarlos por completo[28]. Adenomas de células acidófilas que se presentan en la población más joven son tumores más agresivos. Adicionalmente, los raros tumores plurihormonales con características ultraestructurales de adenoma silente del subtipo 3 presentan un comportamiento más agresivo y de rápido crecimiento, con alto índice de recurrencia tumoral.

Tamaño tumoral: Habitualmente la actividad funcional se correlaciona con el tamaño del tumor. Especialmente en pacientes femeninos, adenomas funcionales, como adenomas corticotropos o prolactinomas, son diagnosticados en etapas tempranas por las características endocrinológicas. En cambio, tumores no funcionales son sospechados cuando producen efecto de masa y usualmente al momento del diagnóstico, son grandes macroadenomas. Dependiendo del tipo de tumor, la curación después de la resección en los microadenomas es alta alcanzando hasta el 85% en acromegálicos, mientras que la resección en los macroadenomas hipofisarios es menos exitosa, con rangos menores de remisión[29].

Invasión tumoral: El término de “adenoma invasivo” aquellos adenomas infiltrativos y destructivos involucrando la dura, hueso, vasos sanguíneos y estructuras nerviosas[30]. La invasión microscópica de la duramadre no es un signo patognomónico de adenoma invasor, encontrándose en el 69% de los microadenomas y arriba del 94% de los macroadenomas, particularmente en aquellos con extensión supraselar [28].

El promedio de frecuencia de invasión basado en observaciones quirúrgicas fue del 40%. Por esta razón, la invasión macroscópica de los tejidos paraselares definidos por estudios de imagen o por hallazgo quirúrgico es considerado un indicador pronóstico más viable.

Marcadores de proliferación, Ki-67: Es una alternativa de la medición de la cuenta mitótica, el Ki-67 representa un instrumento clave para evaluar la actividad de proliferación tumoral. Este anticuerpo reconoce todas las células proliferativas durante todas las fases no-G₀ del ciclo celular, excepto por aquellas células que se encuentran en la fase temprana de G₁[28]. Por lo tanto, la inmunohistoquímica de Ki-67, ofrece información del estado de proliferación de la población celular de los adenomas. El epítipo antigénico de Ki-67, MIB-1, el cual permanece estable después de la fijación con formalina hace que el anticuerpo de Ki-67 (clon MIB-1) pueda usarse de manera rutinaria en las secciones de parafina[31]. Adicionalmente, la estimación del índice de marcaje (IM) del Ki-67, definido como el porcentaje núcleos positivos es muy fácil, reproducible y confiable método. Se ha demostrado que el IM de Ki-67 es bajo en los adenomas no invasivos, y se ha encontrado tres veces incrementado en adenomas con invasión con alto grado de invasión y en el 12% de los carcinomas pituitarios. Por lo tanto, el punto de partida entre un adenoma invasivo y no invasivo se ha establecido en el 3% del IM, con una sensibilidad de 72.7% y una especificidad del 97.3%, con un valor predictivo positivo de 96% y un valor predictivo negativo de 80%[30].

Aunque no está justificado utilizar únicamente el IM de Ki-67 como predictor de comportamiento biológico de los tumores hipofisarios, sin embargo, un alto IM de Ki-67 refleja un crecimiento celular rápido o agresivo de un adenoma hipofisario, lo que traduce a realizar un seguimiento más intenso e investigación clínica para descartar potencial de malignidad[28].

Proteína p53: La expresión del gen del p53 es importante para la biología del tumor. Mutaciones del p53 han sido documentado en adenomas hipofisarios, inmunoreactividad del p53 ha sido correlacionado con la invasión tumoral[30]. Esta ausente en los adenomas no invasivos, y presente en el 15% en los adenomas invasivos y en todos los carcinomas hipofisarios. De acuerdo con la clasificación de neoplasias endocrinológicas de la OMS (Organización mundial de la salud), adenomas con más del 3% de IM de Ki-67 y que sea positivo a mutación del p53 son clasificados como adenomas atípicos, sin embargo algunos investigadores han propuesto designar como adenoma atípico cuando el IM de Ki-67 es mayor de 10%, sin depender del estado del p53.

Apoptosis: Muerte espontánea celular, es caracterizada por la secuencia rápida de eventos llevando a la eliminación de las células dañadas. Apoptosis tiene características morfológicas y bioquímicas distintas a las

de la necrosis. La secuencia morfológica de los eventos apoptóticos incluyen edema celular, pérdida de adhesión de las células adyacentes, marginación de cromatina nuclear y aglutinación de cromatina llevando a la formación de cuerpos apoptóticos, y finalmente activación de fagocitosis por células foliculoesteladas [28]. El espectro de apoptosis en los adenomas hipofisarios ha sido recientemente descrito en detalle [27]. Los adenomas hipofisarios son neoplasias con una baja proliferación celular, por lo tanto, mitosis como apoptosis están ausentes o son difíciles de identificar en tinciones rutinarias. La aplicación de técnica de marcación de DNA intranucleosomal, representa características bioquímicas de apoptosis, que puede utilizarse para identificar células apoptóticas y identificar el índice apoptótico (IA). Un alto IA se identificó en adenomas funcionales en comparación con adenomas no funcionales. También un alto IA fue encontrado en microadenomas particularmente en adenomas corticotropos, y en adenomas no tratados, particularmente en prolactinomas. Actividad apoptótica es observado en adenomas hipofisarios agresivos, atípicos y drogo-resistentes. Por lo tanto, la presencia de actividad apoptótica puede ser considerada como un marcador predictivo [32].

Tumorigénesis hipofisaria

Los adenomas hipofisarios son tumores originados por la expansión de células monoclonales bien definidas; constituye un modelo de tumor altamente estudiado debido a que podemos encontrar un entorno clínico muy vasto, caracterizado por tumores pequeños e indolentes hasta tumores muy agresivos (8,12).

El estudio de la génesis de tumores hipofisarios involucra múltiples áreas, siendo las más importantes:

1. Mutaciones que condicionan síndromes genéticos asociados con tumores hipofisarios.
2. Disregulaciones epigenéticas de reguladores del ciclo celular.
3. Factores de crecimiento local.
4. Disregulación hipotalámica.
- 5.

Sin embargo los dos mecanismos más importantes involucrados en el proceso oncogénico consisten en la activación oncogénica y la activación de genes supresores tumorales, estos pueden aparecer solos o en combinación (13).

El principal oncogen involucrado en la tumorigénesis hipofisaria es el oncogen "GSP", que es una variante mutada de la sub-unidad alfa de la proteína Gs conocida también como GNAS, identificada en tumores hipofisarios productores de hormona de crecimiento. Por arriba del 40% de los somatotropinomas o tumores productores de hormona de crecimiento tiene una mutación somática. Aún no se encuentra completamente entendido como es que estas mutaciones condicionan el desarrollo tumoral, sin embargo la presencia de estas se asocia con un incremento en la fosforilación del AMP cíclico (AMPc) como respuesta a estímulos en proteína de unión a elementos de respuesta, favoreciendo la vía de señalización mitogénica resultante en las células que secretan hormona de crecimiento.

Encontrarse con la activación oncogénica de los tumores resultantes de activación de genes supresores tumorales (GST) usualmente requiere de pérdida de mutaciones inactivadoras en ambos alelos, conocido como "fenómeno de hipótesis de doble golpe de Knudson", el primer golpe es la mutación germinal heredada, una mutación somática o pérdida de un alelo de algún GST; el segundo golpe se da por el apagado del otro alelo. Este segundo golpe frecuentemente es una delección parcial de algún cromosoma condicionando pérdida de la heterocigosidad (LOH) de polimorfismos comunes alrededor de los genes supresores tumorales en el tejido tumoral o puede ser provocado por la metilación de promotores de genes supresores tumorales (14).

Un mecanismo recientemente descrito del segundo golpe involucra un incremento en la regulación de un microRNA el cual apaga el remanente del alelo de los genes supresores tumorales; este mecanismo ha sido descrito en las mutaciones asociadas al gen MEN causante del grupo de enfermedades conocidas como Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1. En los adenomas hipofisarios esporádicos se han descrito pérdida de heterocigosidad (LOH) en aproximadamente 20% de los casos, identificada en el cromosoma 9, cromosoma 11q13 y cromosoma 13 (33).

Los oncogenes y genes supresores tumorales implicados en la tumorigénesis hipofisaria son los siguientes :

ONCOGENES	DEFECTO
Ciclina D1 (CCND1) Cromosoma 11q13	Importante en la regulación del crecimiento celular, permitiendo la entrada a la fase G1. La sobreexpresión de este se ha encontrado en adenomas no funcionales y somatotropinomas.
Gsp (GNAS) Cromosoma 20q13	Expresión alélica en tumores. Mutaciones somáticas activadoras en más del 40% de los somatotropinas y mosaicismo en el Síndrome de McCune-Albright.
RAS Cromosoma 5p13	Mutaciones activadoras somáticas en carcinomas hipofisarios.
PTTG-1 Cromosoma 5q33	Incremento de la expresión en tumores hipofisarios invasores
HMG2 Cromosoma 12q14	La sobreexpresión de HMG2 es común en carcinomas ováricos. Se ha reportado sobreexpresión en adenomas hipofisarios mixtos productores de prolactina y hormona de crecimiento.
Ptd-FGFR4 Cromosoma 5q35	Inicia la transcripción alterna asociada con mayor invasividad en somatotropinomas.

GENES SUPRESORES TUMORALES

AIP Cromosoma 11q13	Mutaciones germinales en síndromes familiares (adenomas hipofisarios familiares aislados) particularmente en familias con somatotropinomas o tumores mixtos productores de hormona de crecimiento y prolactina.
p27Kip1 (CDKN1B) cROMOSOMA 12P13	Mutaciones germinales heterocigotas sin sentido en neoplasia endocrina múltiple tipo 4. Expresión de la proteína disminuida en adenomas esporádicos, especialmente secretores de ACTH, pero no se han encontrado mutaciones somáticas.
p16INK4A (CDKN2A) Cromosoma 9p21	Hipermetilación de regiones promotoras en el desarrollo de adenomas hipofisarios.
p18INK4C (CDKN2C9) Cromosoma 1p32	Hipermetilación de regiones promotoras en el desarrollo de adenomas hipofisarios.
GADD45 gamma Cromosoma 9p22	Supresor del crecimiento, controla la proliferación de células hipofisarias. Se ha identificado la metilación de promotores en adenomas no funcionales, prolactinomas y somatotropinomas.
PKA (PRKAR1A) Cromosoma 17q24	Mutación truncante en el complejo de Carney condicionante de hiperplasia del mamosomatotro y adenomas.
WIF 1 Cromosoma 12q14	Hipermetilación de la región promotora de adenomas hipofisarios, especialmente en no funcionales. Inhibidor de la vía del Wnt, regulada a la baja en adenomas hipofisarios a comparación de células hipofisarias normales.
p53 (TP53) Cromosoma 17q13	Mutaciones inactivadoras somáticas (muy raras) o sobreexpresión en carcinomas hipofisarios.

ZAC1 (PLAGL1/LOT1) Cromosoma 6q24-25	Hipermetilación de la región del promotor en adenomas hipofisarios con mayor frecuencia en adenomas no funcionantes.
Retinoblastoma (RB1) Cromosoma 13q14	Hipermetilación de la región del promotor en adenomas hipofisarios con mayor frecuencia en adenomas no funcionantes y presente en casos raros de carcinomas hipofisarios.
MEN1 Cromosoma 11q13	Mutación inactivadora de línea germinal, siendo el gen afectado el en MEN1 que expresa la proteína menina, identificado en todos los tipos de tumores hipofisarios.
MEG3a Cromosoma 14q32	Pérdida de la expresión como resultado de hipermetilación de una región promotora, encontrado en adenomas hipofisarios no funcionantes y productores de gonadotropinas.
DAPI Cromosoma 5p15	Pérdida de la expresión del DAP cinasa en adenomas invasores.
Wee1 Cromosoma 11p15	Cinasa wee1 es una proteína nuclear que retarda la mitosis por fosforilación de ciclina 1. La reducción de la expresión de Wee1 se ha reportado en adenomas no funcionantes y productores de GH.
PTAG Cromosoma 22q12	Apoptosis tumoral hipofisaria por metilación de CpG asiladas y pérdida de transcripción.

Origen genético de adenomas hipofisarios

La gran mayoría de los adenomas hipofisarios son tumores de presentación esporádica, sin embargo la minoría pueden ser manifestaciones de síndromes hereditarios siendo los mas frecuentes la Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 (NEM 1) condicionada por una mutación en el gen supresor tumoral MEN 1*613733 y el complejo de Carney determinado por una mutación en el gen de la subunidad reguladora 1a de la proteína cinasa A (PRKAR1a*160980); en estos los adenomas hipofisarios se pueden presentar en mutaciones en mosaico post-cigotas en el gen GNAS (el mismo gen afectado en las mutaciones en GSP mencionadas previamente). Existe otra entidad clínica, los Adenomas Hipofisarios Aislados Familiares (FIPA por sus siglas en inglés) condicionado por una mutación en el gen AIP-*605555 (13,14,33,34).

En los adenomas hipofisarios funcionantes y no funcionantes se han identificado la asociación familiar en el 5% de todos los casos (14,33,34,35). Las mutaciones germinales en el gen AIP predispone al desarrollo de las mutaciones adenomas hipofisarios. Entre el 15 y el 20% de los pacientes con adenomas hipofisarios familiares aislados tienen mutaciones heterocigotas inactivadoras. La prevalencia se eleva del 40 al 50% en familias con acromegalia familiar y familias con prolactinomas o somatotropinomas (36).

GEN AIP

El gen AIP se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 en la región 13 (11q13), en la vecindad (3 Mb distal) del gen MEN1. El gen AIP contiene 6 exones que codifican una proteína co-chaperona de 330 aminoácidos, cuenta con un peso molecular de 37 kDa, ha recibido múltiples denominaciones como proteína 2X asociada al virus de hepatitis B, proteína de interacción con el receptor de hidrocarburos arilados (AIP) o proteína 37 unión a FK506.

La región amino terminal de la proteína de interacción con el receptor de hidrocarburos arilados cuenta con un dominio similar a las inmunofilinas, similar a las inmunofilina FKBP12 YFKBP52; sin embargo AIP difiere de estas debido a que no cuenta con la habilidad con fármacos inmunosupresores como ciclosporina o rapamicina. La región carboxilo-terminal contiene siete alfa hélices constituidas en 3 estructuras de 34 aminoácidos denominados dominios teratricopéptidos, con 2 hélices, y una última conocida como hélice; estas estructuras son necesarias para la interacción proteína-proteína AIP con su ligando, la estructura tridimensional de la proteína se observa en la figura 1 (37).

Mecanismo de acción

La proteína de interacción con el receptor de hidrocarburos arilados en las células del somatotropo y lactotropo se encuentra relacionado con la secreción de las vesículas de secreción citoplasmática; así mismo se han identificado relaciones con múltiples vías de señalización intracelular. Su mecanismo de acción consiste en unirse al receptor de hidrocarburos arilados (AHR) y permitir la unión del complejo receptor de hidrocarburos arilados con el traductor nuclear de hidrocarburos arilados (ARNT) conocido también como complejo AHR/ARNT, el cual regula la proliferación celular e induce la detención del ciclo celular, por lo que su falta de acción aumenta la tumorigénesis hipofisiaria; así mismo se ha observado que se une con diferentes sitios de respuesta celular como el sitio de elementos de respuesta a la hipoxia y la transcripción de genes relacionada con la hipoxia.

El receptor de hidrocarburos arilados (AHR) se encuentra en un complejo multiproteico que incluye dos proteínas de choque térmico 90Kd (HSP90) y la proteína AIP; el AHR es un factor de transcripción activador que es miembro de la superfamilia de los factores de transcripción con dominio bHLH-PAS (basic hélix loop hélix-PER ARNT-SIM). Esta familia de proteínas desempeña un papel importante en diversos procesos celulares como desarrollo, adaptación a hipoxia, control del ciclo circadiano y metabolismo de xenobióticos. Estas proteínas se dividen en dos clases: Clase I (Alfa) y clase II (Beta). La expresión de las proteínas de la clase I, generalmente esta restringida a un tejido o es regulada por una señal y forman hetero-dímeros solo con las proteínas de la clase II, mientras que la clase II, es ubicua o su expresión no esta sometida a regulación y puede formar homodímeros con proteínas de su misma clase (37).

Via de señalización del AHR

La activación del AHR, está dada por la unión de un ligando. Estos ligandos son principalmente xenobióticos, bilirrubina, lipoxina A4 y derivados del triptófano.

La activación del AHR se caracteriza por su translocación al núcleo y la disociación del complejo al cual está unido. Una vez en el núcleo, el AHR, forma un heterodímero con la proteína traslocador nuclear del receptor de arilos (ARNT). Este heterodímero AHR/ARNT interaccionará con proteínas acetil-transferasas de histonas y factores remodeladores de cromatina, lo que resulta en la unión del complejo AHR/ARNT a una secuencia de ADN consenso (GCGTGA) conocida como elemento de respuesta a xenobióticos o elementos de respuesta a dioxinas (XRE, DRE).

Esta secuencia esta localizada aproximadamente a 1 Kb río arriba de sus genes blanco. Dentro de estos genes se incluyen aquellos que codifican enzimas de fase I del metabolismo de xenobióticos, representada por citocromos P450 (CYP450) y de la fase II la cual incluye a las glutatión S-transferasas (GST) y las UDP glucoronil transferasas (UGT). Ver figura 2.

Sin embargo se han descrito al momento vías de señalización que pudieran estar relacionadas con la tumorigénesis hipofisiaria debido a que tiene relación con la inhibición y estimulación de la proliferación celular, induce la detención del ciclo celular, regula la producción de AMPc, estimula al transcripción de genes relacionados con hipoxia, así como la respuesta adaptativa a la hipoxia. Debido a que esto efectos es que se considera que al encontrarse mutaciones en el gen AIP que afecte la vía de señalización del complejo AHR/ARNT condicionan el desarrollo tumoral (37).

Mutaciones en el gen AIP

Leontiou encontró que la sobreexpresión de la variedad salvaje de AIP en línea celulares hipofisiarias y en fibroblastos humanos disminuye dramáticamente la proliferación celular, por lo que la presencia de mutaciones en la proteína y gen AIP pueden condicionar que este control se vea afectado. La evaluación funcional de las mutaciones AIP fue consistente con un probable efecto supresor tumoral identificando en pacientes portadores de acromegalia familiar; Leontiou concluye que la expresión anormal y localización subcelular de AIP en adenomas hipofisiarios esporádicos indican una regulación inadecuada de esta proteína durante la tumorigénesis (34).

En una gran cohorte Finlandesa realizada con pacientes portadores de adenomas hipofisiarios de componente familiar se identificaron mutaciones en el gen AIP, 5 casos de portadores de prolactinomas, 4 somatotropinomas y 2 con presencia de tumores mixtos. La mutación identificada fue la Q14X, identificada igualmente en 6 de 45 pacientes Finlandeses con acromegalia. Una mutación en el gen AIP fue también identificada en dos gemelos italianos con somatotropinas, por lo que Vierimaa postuló que el fenotipo representa una predisposición genética hacia el desarrollo de adenomas hipofisiarios con baja penetrancia (17).

En 9 de 460 pacientes de Europa y Estados Unidos portadores de adenomas hipofisarios se identificaron 9 diferentes mutaciones en el gen AIP, 8 de estos con presencia de adenomas productores de crecimiento y 1 con Enfermedad de Cushing (39).

Daly, estudió la frecuencia de mutaciones en el gen AIP en una gran cohorte de pacientes con adenomas hipofisarios familiares (FIPA) en 36 centros de referencia. En su primer estudio de 2007 encuentra a 73 familias con FIP fueron identificadas con 156 pacientes portadores de adenomas hipofisarios, en esta cohorte se dividió a los pacientes en 2 cohortes con expresión homogénea o heterogénea del tumor. Once de las familias tuvieron 10 mutaciones para AIP, 9 de ellas fueron mutaciones nuevas; sin embargo de los hallazgos más representativos en esta cohorte es que los tumores eran más grandes ($p=0.0006$) en pacientes con mutaciones positivas vs mutaciones negativas. Los tumores que presentaron mutaciones en el gen AIP fueron adenomas productores de hormona de crecimiento, mixtos (hormona de crecimiento y prolactina), prolactinomas y adenomas no funcionantes; aproximadamente el 85% de la mutaciones encontradas fueron en adenomas productores de hormona de crecimiento y el 50% de los adenomas productores de hormona de crecimiento se encontraron sin evidencia de mutación (40). En el artículo publica en 2010 describe que los pacientes con mutaciones en AIP fueron predominantemente hombres jóvenes (63.5%) con inicio de síntomas en la infancia/adolescencia y que al momento del diagnóstico el 93.3% tenían macroadenomas con extensión e invasión; siendo un 78.1% diagnosticados con somatotropinomas, 13 pacientes con prolactinomas, 7 pacientes con adenomas no funcionantes y 1 productor de TSH. Los pacientes con mutaciones tenían tumores más grandes ($p=0.00026$), niveles más altos de GH ($p=0.00068$) con un inicio de síntomas hasta 2 décadas antes que los controles ($p=0.000001$). Se demostró con resultados estadísticamente significativos que los pacientes portadores de la mutación requerían más intervenciones quirúrgicas y necesidad de tratamiento adyuvante (46).

Al momento se han descrito 70 diferentes mutaciones localizadas en todas las regiones del gen AIP, se han descrito mutaciones sin sentido, en sitios de splicing, inserciones, deleciones, en la región del promotor, del gen completo y en la región de codificación; sin embargo pese a la gran cantidad de mutaciones son pocos los casos descritos de cada una de estas. Las mutaciones más frecuentes son c.019C>T (p.R304X), c.40C>T (p.Q14X), c.811C>T (p.R271W) y c.241C>T (p.R81X); cada una de ellas con un número no mayor a 40 casos (41).

Experiencia previa con pacientes Mexicanos referida en la literatura por Ramirez en 2016, habla sobre su cohorte en paciente con acromegalia y su frecuencia de la mutación (similar a frecuencia a lo descrito en la literatura mundial). En específico describe el caso de una paciente de 9 años con gigantismo en la cual se identifica la mutación c.910C>T (p.Arg304Ter) al igual que en su gemela idéntica. Se puntualiza la mutación de novo (posterior a describir los hallazgos en los padres) y se hace hincapié en el carácter de penetrancia no completa en el mismo al sólo una de ellas manifestar clínica (48).

MUTACIONES IDENTIFICADAS EN EL GEN AIP

MUTACIONES CODIFICANTES DE PROTEÍNA TRUNCADA	MUTACIONES EN EL CODON INICIACIÓN	MUTACIONES EN MARCO DE LECTURA Y PROTEÍNA TRUNCADA	DUPLICACIÓN EN SITIO DE LECTURA
c.40C>T c.64C>T c.70G>T c.241C>T c.424C>T c.490C>T c.550C>T c.601A>T c.646G>T c.649C>T c.662dupC c.715C>T c.721A>T c.783C>G c.804A>C c.910C>T	c.2T>C DELECCIONES EXTENSAS c.878_879A>GT y C c.880_891delCTGGACCCAGCC c.1104_109_279+578 c.100-1025_279+357del c.1-?_993+?Del MUTACIONES INTRÓNICAS IVS3-2A>G IVS3+1G>A IVS3-1G>A IVS2-1G>C MUTACIONES SIN SENTIDO c.721A>G c.769A>G c.803A>G c.811C>T c.829G>C c.871G>C c.872T>A c.911G>A	c.3_4insc c.88_89del GA c.74_81delINS7 c.244_248delGAAGG c.249G>T c.286_287delGT c.350delG c.338insACCC c.404delA c.500delC c.517_521delGAAGA c.543delE c.752delT c.824_825insA c.854_857delAGGC c.919insC MUTACIONES SIN SENTIDO Y DEL GEN COMPLETO	c.805_825dup SUSTITUCIONES pb c.(-270-269CG>AA) c.(220G>A) DELECCIONES EN MARCO DE LECTURA c.66_71delAGGAGA c.139_161del24 c.742_744delTAC MUTACIONES SIN SENTIDO Y DEL GEN COMPLETO c.26G>A c.166C>A c.174G>C c.250G>A c.308A>G c.509T>C c.563G>A c.584T>C c.713G>A c.718T>C c.974G>A
MUTACIONES EN SITIO DE SPLICING c.591G>A c.807C>T			

Características clínicas

Sin importar el tipo de mutación, la presentación clínica es muy similar en todos los pacientes, la característica “sine qua non” es la edad de aparición, menor a 40 años de edad al inicio de la enfermedad, habitualmente el 50% inicia a los 18 años. El diagnóstico se acorta de generación en generación y la edad de presentación es mas temprana que en los tumores esporádicos.

Las características clínicas mas significativas de los pacientes portadores de adenomas hipofisarios y mutaciones en el gen AIP son las siguientes (36,38,39,40,42,43,44,45,46):

- Edad de inicio antes de los 40 años de edad
- Comportamiento agresivo, es decir se ha observado la presencia mayor identificación de macroadenomas hipofisarios y mayor invasividad 84.6% en pacientes portadores vs 59.6% de los no portadores.
- Menor respuesta tratamiento farmacológico en el caso de pacientes portadores de adenomas hipofisarios productores de hormona de crecimiento menor respuesta al empleo de análogos de somatostatina y agonistas dopaminérgicos en el caso de prolactinomas. No hay estudios relacionados al empleo de otras terapias como Pegvisomant.
- Mayor susceptibilidad a apoplejía hipofisaria.

Población esporádica

Como hemos comentado la gran mayoría de las poblaciones estudiadas son las de tipo familiar, en algunos estudios se han reportado la presencia de mutaciones en población con presentación esporádica, sin embargo es poca la información con la que contamos al momento, sin embargo la presento en la siguiente tabla donde se indica el numero de pacientes estudiados con adenomas hipofisarios esporádicos y el numero de mutaciones encontradas en estas poblaciones:

SERIE	PRESENTACIÓN	LUGAR	NO. PACIENTES	% MUTACIÓN
Cazabat 2007	GH esporádicos	Francia	154	3% (5 pac)
Leontiou 2008	Familiar y esporádico	Multicéntrico	121	20.7% (31 pac) FIPA 0% esporádicos
Cazabat 2012	Esporádicos	Francia	443	3.6% (16 pac)
Hernandez-Ramírez 2015	Familiar y esporádicos	Multicéntrico	1725	8.3% (144 pac)

Tabla 1 FRECUENCIA DE MUTACIONES EN EL GEN AIP EN ADENOMAS HIPOFISIARIOS ESPORÁDICOS

Portadores asintomáticos de mutación AIP

Debido a las características clínicas y el impacto en la evolución natural de los adenomas hipofisarios asociados a mutaciones germinales es importante iniciar la búsqueda intencionada de estas para tener mayor vigilancia, modificación constante de tratamientos así como estudio familiar para la búsqueda de personas afectadas y/o portadoras de la enfermedad.

Actualmente se recomienda que a todas las personas con antecedente familiar de adenomas hipofisarios se realice un estudio genético para la búsqueda de mutaciones causales de los mismos; las mutaciones en el gen AIP se incluyen en el screening de estudio sin embargo son pocos los lugares del mundo donde es posible realizarlo; así mismo si se identifica una mutación deben de realizarse estudios de laboratorio e imagen mediante resonancia magnética de hipófisis de forma regular (44).

Planteamiento del problema

Se desconoce la prevalencia de mutaciones germinales en el gen AIP en la población mexicana portadora de adenomas hipofisarios funcionantes y no funcionantes.

Hipótesis

Existe una prevalencia del 8 al 10% de mutaciones germinales del gen AIP en los pacientes portadores de adenomas hipofisarios en la población atendida en el INNN.

Objetivos

Objetivo principal:

- Identificar la prevalencia de mutaciones germinales del gen AIP en pacientes portadores de adenomas hipofisarios funcionales y no funcionales en los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “MVS”

Objetivos secundarios:

- Realizar la correlación entre genotipo-fenotipo entre las muestras de tejido tumoral y sangre periférica.
- Conocer las manifestaciones clínicas y evolución de la enfermedad en los pacientes portadores de adenomas hipofisarios con mutaciones germinales en el gen AIP.
- Evaluar a familiares de pacientes portadores de mutación en el gen AIP e identificar la presencia de adenomas hipofisarios o portadores asintomáticos.

Justificación

El Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía es el centro de referencia del país para los pacientes portadores de enfermedades neurológicas, incluyendo las tumoraciones intracraneales. El 42% de los pacientes portadores de adenomas hipofisarios funcionales o no funcionales tiene menos de 40 años de edad al momento del diagnóstico. Anualmente, en el Instituto, se interviene quirúrgicamente por primera vez aproximadamente a 120 pacientes portadores de adenomas hipofisarios.

En nuestro país existe poca investigación relacionada con la identificación de mutaciones en el gen *AIP* en adenomas hipofisarios. Recientemente, el grupo de investigación del Centro Médico Nacional SXXI en cooperación con el INNN, presentó una cohorte de 30 pacientes portadores de acromegalia identificando la presencia de dicha mutaciones en el gen *AIP* en el 7%.

Es importante mencionar que en la población atendida en el INNN las manifestaciones de la enfermedad hipofisaria son de inicio más tempranas, con presencia de mayor morbilidad y de evolución más agresiva que amerita múltiples tratamientos médicos, quirúrgicos y de radioterapia; por lo tanto consideramos necesaria la presencia de mayores herramientas que nos permitan brindar un mejor diagnóstico y tratamiento, así como brindar tratamientos coadyuvantes de manera oportuna.

La experiencia institucional y la literatura universal nos han enseñado que cada adenoma hipofisario debe ser tratado de forma individualizada, de acuerdo a los antecedentes personales y quirúrgicos del paciente, así como a la extensión suprasellar e invasión de la tumoración a las estructuras adyacentes; adicional a esto el conocimiento de la condición de “portador de la mutación” del paciente, puede ser determinante en la elección del abordaje quirúrgico y de la necesidad de equipo adicional neuro-quirúrgico.

Trascendencia

Este proyecto tiene como finalidad obtener un mayor conocimiento de la enfermedad de la enfermedad desarrollada en los pacientes con adenomas hipofisarios, que repercutirá en un mayor control de la misma. La caracterización de un perfil genético ayudará a identificar los casos que se beneficien de terapia blanco; parte de la “personalización” de tratamiento que en un futuro se espera sea para todo tipo de enfermedad tumoral.

Al tener identificados a los pacientes con un probable comportamiento mas agresivo de la enfermedad, se tendrá un mejor apego y por ende un mejor manejo de los mismos, lo cual disminuirá las complicaciones sistémicas originadas por la misma. Al tener menores complicaciones sistémicas el costo por paciente para la institución y el país disminuye y el sistema de salud se ve beneficiado.

Impacto directo en la comprensión de la historia natural de los adenomas hipofisarios, tratamiento clínico y prevención de complicaciones asociados a riesgo cardiovascular, renal, sistema muscular, etc. Hablandono de una entidad con etiología meramente a nivel de sistema nervioso central, enfermedad endocrinológica de origen neurológico.

Metodología:

a) Diseño.

Se realizó un estudio observacional y transversal, en el que se incluyeron pacientes con diagnóstico de adenoma hipofisario funcionante y no funcionante con síntomas de inicio de la enfermedad antes de los 40 años de edad, que son tratados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

El sitio de captación inicial fue la clínica de Neuroendocrinología en el área de consulta externa así como el área de hospitalización del servicio de Neurocirugía; se explicó el protocolo, firma de consentimiento informado y posteriormente se realizó la obtención de DNA genómico, realización de PCR de punto final para la identificación del gen *AIP*, *menina* y *PRKAR1A*. Posteriormente se realizó reacción de secuenciación, purificación y secuenciación de los productor e interpretación de los resultados.

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del INNN MVS en el periodo de Marzo 2017 a Febrero 2018; aquí se captaron los pacientes y se llenaron los consentimientos de los pacientes. Se realizó la recolección de muestras en el área de consulta externa, primer piso de hospitalización.

Paralelamente se hizo revisión de expedientes de los pacientes seleccionados en el archivo clínico del INNN MVS así como en el expediente electrónico, estudio de imagen y resultados de estudios de laboratorio para registrar variables acorde al tipo de adenoma en estudio, así como datos demográficos y meramente estadísticos asociados a los pacientes en seguimiento.

b) Población y muestra

Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico de adenoma hipofisario y menores a 40 años al momento del diagnóstico del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Dr. Manuel Velasco Suárez” que aceptaran participar en el estudio y que accedieran a la toma de muestra.

c) Criterios de selección del estudio

Inclusión:

- Pacientes menores de 40 años de edad al inicio de la sintomatología
- Diagnóstico clínico, bioquímico, imagen y/o histopatológico de adenomas hipofisarios no funcionales y funcionales (productores de hormona de crecimiento, prolactina y ACTH)
- Expediente clínico completo
- Acepten participar en el estudio

Exclusión:

- Edad al inicio de la sintomatología mayor de 40 años de edad
- Diagnóstico o datos clínicos que sugieran de Neoplasia Endocrina Multiple tipo 1, Síndrome de Carney, Adenomas Hipofisarios Familiares aislados o síndrome de McCune-Albright
- No acepte participar en el estudio
- Pacientes con diagnóstico de lesión selar no adenomatosa
- Pacientes con otras patologías endocrinas asociadas.

Criterios de no inclusión:

- Pacientes que deseen retirar el consentimiento informado del estudio
- Pacientes que no completen estudios
- Pacientes con muestras insuficientes, de mala calidad o incompletas
- Pacientes que se pierdan del seguimiento clínico.

d) Variables analizadas:

VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL	DEFINICION CONCEPTUAL	INSTRUMENTO DE MEDICION	UNIDAD DE MEDICION	TIPO
Demográficos	Edad	Años cumplidos	Historia Clínica	Años	Cuantitativa discontinua
	Género	Masculino Femenino		M ó F	Cualitativa dicotómica
Adenoma hipofisario no funcionante	Macroadenoma Microadenoma Adenoma invasor Gigante	Tumor benigno de hipófisis no condicionante de síndrome clínico de hipersecreción tumoral	Resonancia Magnética	Escala Hardy-Vezzina en grado I-IV y de la A-D	Cualitativa ordinal
			Volumen tumoral		Cuantitativa continua
Adenoma hipofisario funcionante	Acromegalia Enfermedad de Cushing Prolactinoma Tirotrpinoma	Tumor benigno de hipófisis condicionante de síndrome clínico de hipersecreción tumoral	Resonancia Magnética	Escala Hardy-Vezzina en grado I-IV y de la A-D	Cualitativa ordinal
			Volumen tumoral Pruebas específicas		Cuantitativa continua
Mutación en gen AIP	Presencia de mutaciones mediante secuenciación del gen AIP	Presencia de mutación en el gen AIP.	PCR	mutaciones sin sentido sitio de splicing Inserción Inserción, Delección, en la región del promotor y en la región de codificación	Cualitativa ordinal

e) Análisis estadístico:

La evaluación del análisis estadístico se realizó con el software paquete de análisis SPSS versión 22.0 (IBM Corp., Armonk, New York, USA).

La significancia estadística fue establecida como $P \leq 0.05$ en la base de un modelo de hipótesis a 2 colas sin ajustes para comparaciones múltiples.

Las medidas de tendencia central son presentadas como medias demostrando que la agrupación de los datos siguió una distribución paramétrica o normal (donde el 95% de los datos se encuentran de ± 2 Desviaciones estándar de la media).

Usamos el método de Chi Cuadrada para las variables categóricas o nominales expresadas en frecuencias, u proporciones en cuyos casos las condiciones fuesen mutuamente excluyentes.

Las variables ordinales se evaluaron por el método de ANOVA para un factor, asumiendo una hipótesis nula para la distribución actual, con prueba descriptiva y de homogeneidad de varianza, para los Grupos GH, PRL, NF, Cushing, comparando las medias respectivas, y análisis Post-hoc por el método DMS.

f) Consideraciones éticas:

Este protocolo se ha diseñado con base en los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos aceptadas por la 18ª Asamblea mundial de Helsinki y la 64ª Asamblea llevada a cabo en la ciudad de Fortaleza, Brasil 2013.

g) Aporte financiero:

Los reactivos y material necesario se compraron con apoyo del fondo de Neuroendocrinología.

Resultados

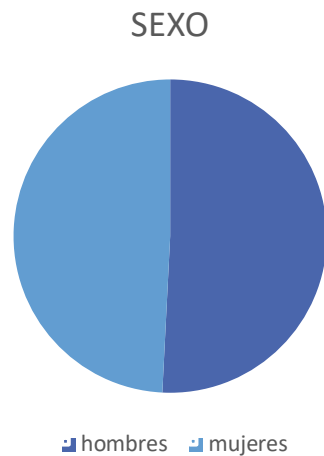
Se incluyeron 100 pacientes de la consulta externa de neuroendocrinología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”, de Marzo del 2017 a Febrero del 2018 que cumplieran con los criterios de inclusión hombres y mujeres menores de 40 años con diagnóstico de adenoma hipofisario funcional y no funcional que aceptaran participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado.

Durante la consulta a los pacientes que aceptaran participar en el estudio se les tomó muestra de sangre periférica para posteriormente realizar la extracción del ADN. A estos 100 pacientes encontrados se les tomó muestra para extracción de ADN realizándoles electroforesis en geles de agarosa al 0.5% para verificar la integridad y cuantificación de ADN mediante espectrofotometría de masas. Se inició el análisis para la secuenciación del gen AIP.

En cuanto al análisis de la base de datos en la revisión de expedientes de los pacientes con muestras útiles se encontraron 61 con las características necesarias para el análisis.

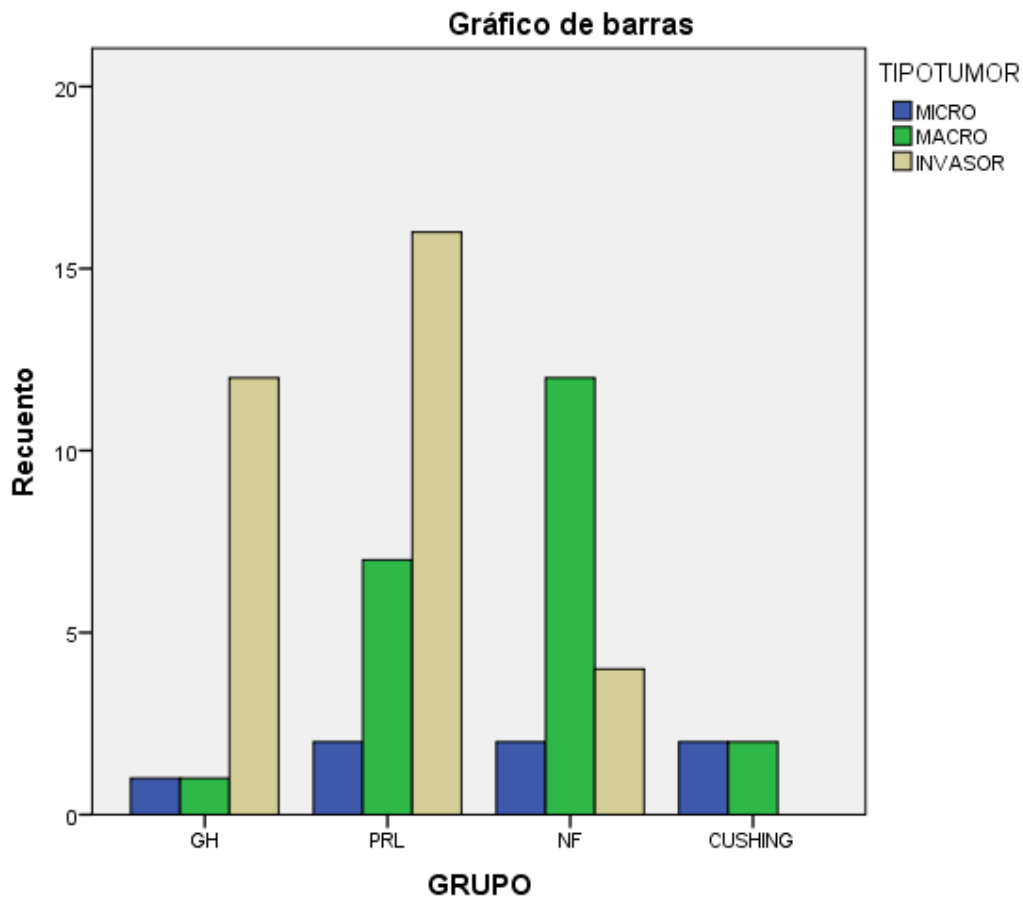
Todos los pacientes eran de raza hispana con un ligero predominio de 31 hombres (50.81%), sin significancia estadística encontrada ($p=.616$). Encontramos que el promedio de seguimiento de los pacientes era de 202 meses.

□

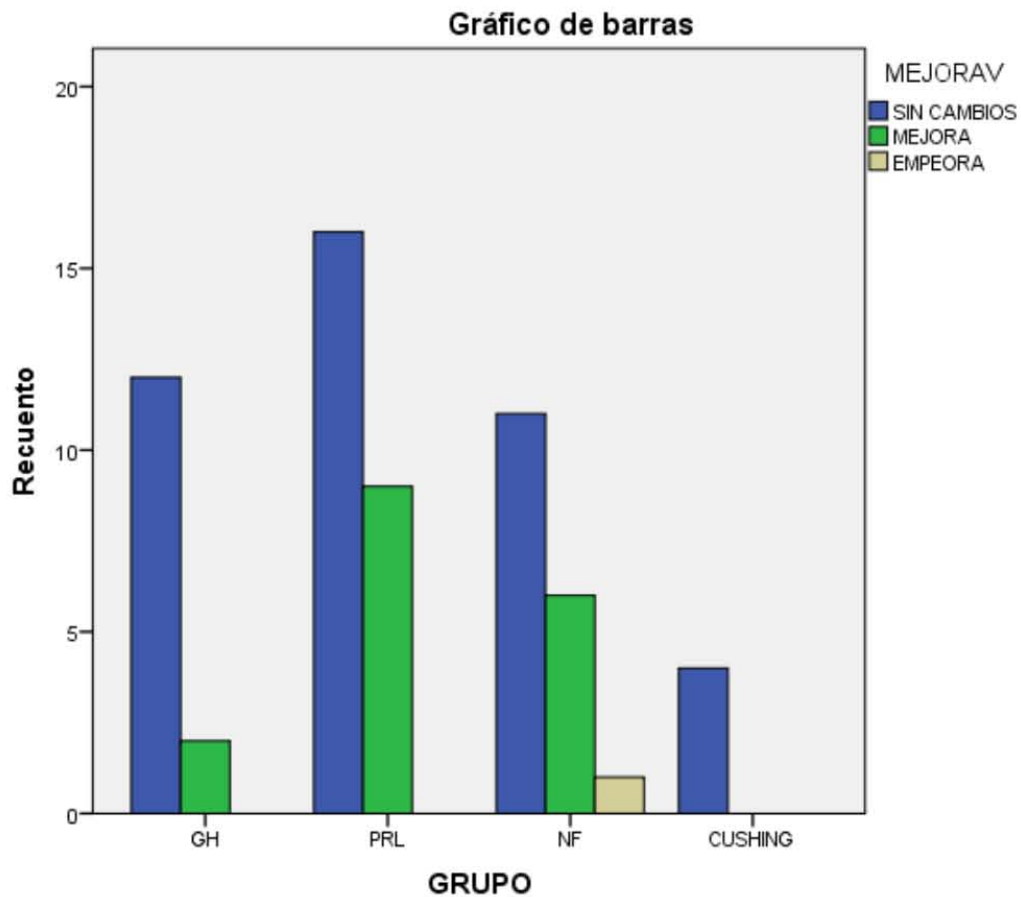


Se reportan un total de 14 (23%) adenomas productores de GH con una edad media de 26.71 años, 25 (41%) prolactinomas edad media de 28.12 años, 18 (29.5%) de adenomas no funcionales con edad media de 29.83y 4 (6.6%) adenomas productores de ACTH con edad media de 27 años. Se observa una tendencia en la cual el diagnóstico de los no funcionales es a mayor edad, esto probablemente asociado a los cuadros sindromáticos que despiertan los tumores funcionales, aunque esto no fue estadísticamente significativo.

De los 61 tumores 7 (11.47%) fueron microadenomas, 22 (36.06%) macroadenomas y 32 (52.45%) de tumores invasores. Hasta el 50% de los prolactinomas fueron reportados como tumores invasores y ninguno de los pacientes con enfermedad de cushing tenían datos de tumores invasores.



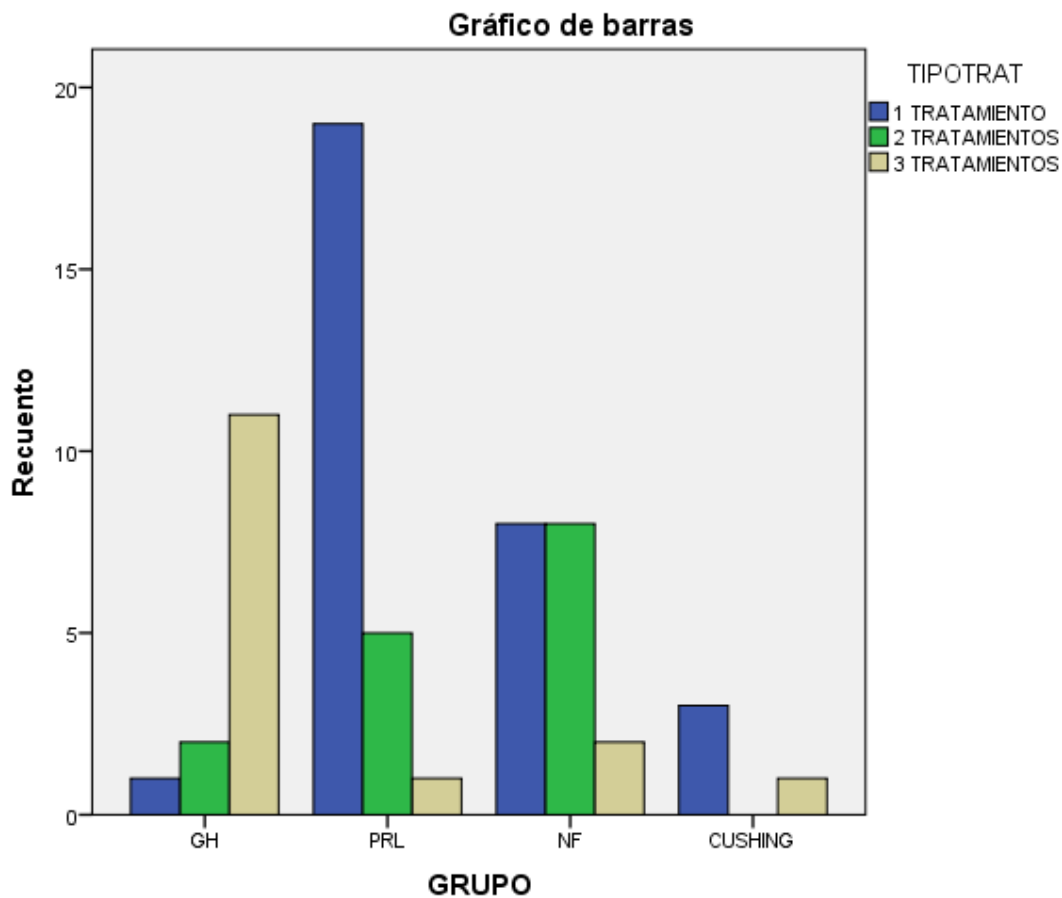
El síntoma más frecuente reportado por los pacientes como clínica inicial fue la afeción de agudeza visual. Encontramos que la mitad (49.1%) de los pacientes de la cohorte se encontraban con algún grado de disfunción visual pre-quirúrgica, esto obviamente asociado al tamaño tumoral, por lo cual los pacientes menos afectados eran los que contaban con tumores más pequeños, como el grupo de ACTH. Con una mejoría en el postquirúrgico del 61.74% de los pacientes con afeción visual reportada con anterioridad a la cirugía e identificando a los prolactinomas como el grupo que reportaba el porcentaje más alto de mejoría visual post-tratamiento (52.9%). El resto de síntomas debut fueron amenorrea y apoplejía en 29.78%, galactorrea en 17%, hidrocefalia en 28.57%, obstrucción nasal y epilepsia en 21.42% y por último paresia de algún nervio craneal en 6.38% y fistula esporádica en 2.12%.



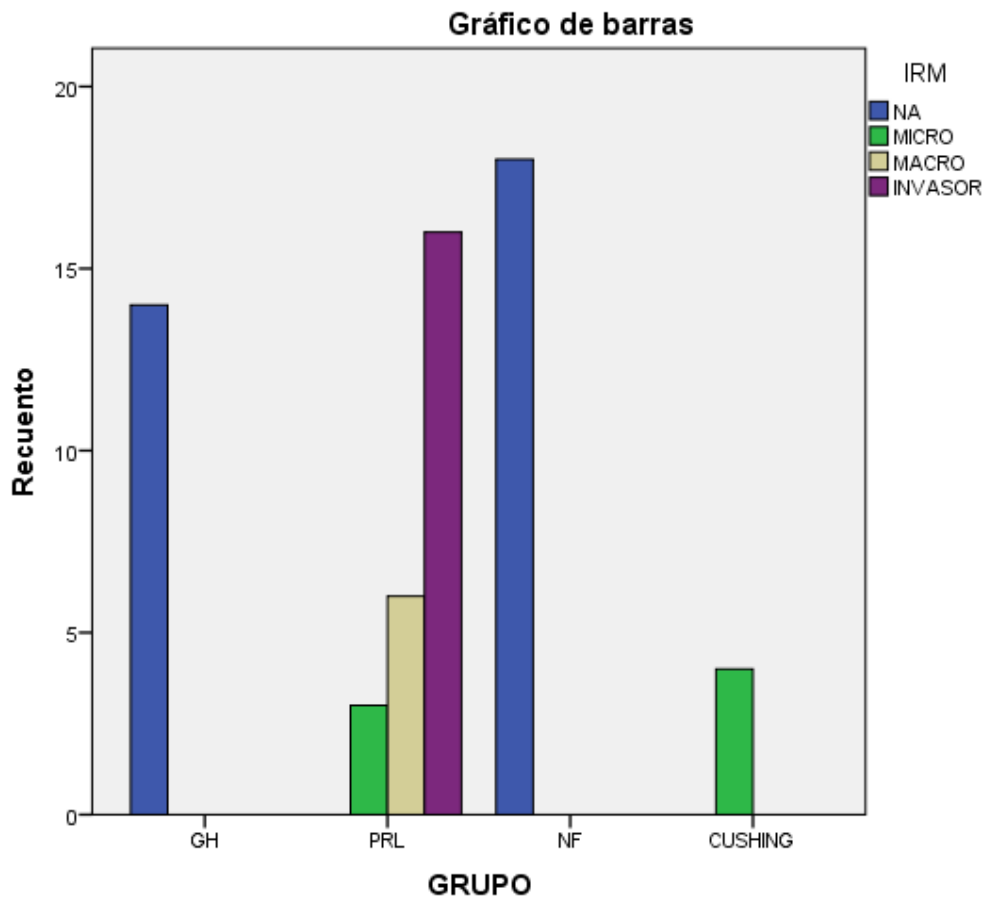
De los pacientes con tumores funcionales encontramos un promedio de GH al momento de diagnóstico de 59.79 (3.76-264.5) y un Index de IGF promedio de 3.2 (1.54-3.59), una prolactina al momento del diagnóstico de 6089.25 ng/ml y un cortisol, en los ADH ACTH, promedio de 27.27 al momento del diagnóstico.

Un total de 38 pacientes requirieron manejo quirúrgico; 100% de los pacientes con ADH GH y los pacientes con síndrome de Cushing, 83.33% de los ADH NF y 20% de los pacientes con prolactinomas. En cuanto al tipo de abordaje 66.66% de los pacientes sometidos a cirugía fue por vía endonasal asistida por endoscopia, 33.3% por vía transepto esfenoidal con microcirugía y sólo el 20% por un acceso dorso lateral.

Siguiendo con el tipo de tratamiento encontramos que la mitad (49.1%) de los pacientes en nuestra cohorte fueron candidatos a más de un manejo terapéutico que incluía múltiples cirugías, necesidad prolongada de ingesta de análogos de Somatostatina y/o variadas modalidades de radioterapia. Llama la atención que el 61.4% de los pacientes con prolactinomas eran candidatos solo a tratamiento médico con favorable respuesta pero hasta el 73.3% de los pacientes con ADH GH fueron candidatos a las 3 modalidades de tratamiento. El 14.75% de los pacientes necesitaron someterse a cirugía en más de una ocasión, predominando de igual manera los pacientes con ADH GH con un 66.7%. En cuanto a resistencia a tratamiento médico con análogos de somatostatina encontramos una resistencia del 36% de los pacientes con Prolactinomas.

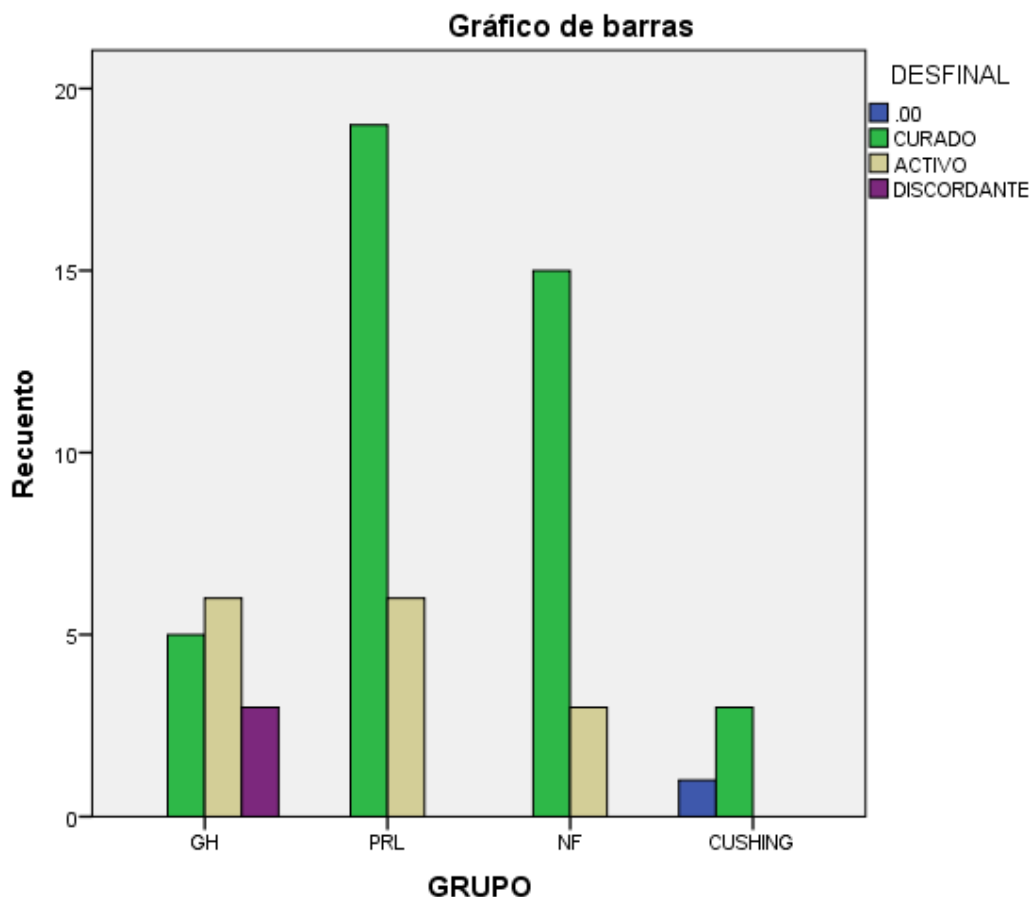


De los estudios de imagen podemos reportar que el 26.2% de los pacientes tenían características reportadas en Resonancia Magnética como sugerentes de invasión, siendo el 100% de estos Prolactinomas; un 48% de pacientes con invasión al seno cavernoso y actualmente un 11.47% de los pacientes se reportan en la RM con datos que sugieren importante remanente tumoral.



En el seguimiento de los pacientes reportamos en los ejes hormonales un total de 63.93% de pacientes con hipotiroidismo, 40.98% con hipocortisolismo, 37.70% con hipogonadismo y un 14.75% con Diabetes Insípida. El eje más afectado es el tirotrópico y con una tendencia de afección de todos los ejes predominante en pacientes con ADH GH, probablemente asociado al mayor número de tratamientos empleados descritos con anterioridad.

Observamos que aún con los múltiples tratamientos proporcionados el 42.85% de los pacientes con ADH GH seguían activos y solo un 35.7% cumplían con criterios de curación; el resto se encontraban con parámetros discordantes. Adenomas con enfermedad de Cushing se encuentran en criterios de remisión un 75% y 76% de los prolactinomas y 83.33% de los ADHNF al seguimiento se encuentran bajo control.



En cuanto la secuenciación analítica queda reportar lo siguiente. Como se mencionó se obtuvieron un total de 100 muestras de pacientes que cumplían con los criterios de inclusión del estudio y que aceptaron participar en el mismo. A través de un análisis de la calidad de las muestras disponibles sólo 66 resultaron útiles para su posterior secuenciación, esto asociado a cuestiones de problemas de concentración de DNA, pureza e integridad resultado de defectos en la extracción por factor mecánico.

De estas 66 muestras seleccionadas, 8 no amplificaron para ningún exón de AIP. Estas muestras fueron sometidas a secuenciación para otros genes y 4 de ellas (6%) obtuvieron resultados; concluyendo que es probable que la mitad de estas muestras (las que codificaron para otros genes más no para AIP) sean las que cuentan con alguna mutación para el gen en cuestión, y que la falta de amplificación se deba a un error en la secuencia del gen. Las Muestras 18,19,20 y 21 son las que no amplificaron para ningún gen y deberán ser recuperadas.

Por el momento hemos analizado 4 cones encontrando mutaciones descritas y no descritas. Para el exón 1 se han realizado 83 muestreos, para el exón 2 88 muestreos y para el exón 3 28 muestreos. A través de la secuenciación de los primeros 3 exones se han tenido resultados sobre variantes genéticas tanto previamente reportadas como no reportadas.

Por el momento podemos reportar que en la región codificante del exón 1 encontramos variantes no reportadas de C>T en dos pacientes sin resultar en un cambio de isoleucina por isoleucina. Se han encontrados también otros polimorfismos, redactados a continuación, todos ellos confirmados en bases informáticas para comprobar si existe un reporta previo y descripción de su naturaleza.

- Iso5Val polimorfismo RS1258945045, en el paciente 30. Reportada como una variante benigna.
- Gli12arg polimorfismo RS735693426, paciente 33. Reportada como probablemente dañina.
- Glu24Asp polimorfismo RS201958318, paciente 33. Reportada como probablemente benigna.
- Asp30Asn G>A GAT>TAT polimorfismo RS1323103083 en el paciente 36, 65, 66, 70, 72, 75-78
- Asp30Glu polimorfismo RS374324200 en el paciente 27; reportada como variante sinónima.

NO. DE PACIENTE	POLIMORFISMO	EDAD AL DX	TIPO DE TUMOR	TRATAMIENTOS UTILIZADOS	CONTROL	NATURALEZA
27	Asp30Glu RS374324200	30	NF Macro	Qx	Control	Sinónima
33	Gli12arg RS735693426 Glu24Asp RS201958318	27	GH Invasor	QX(2)+MD	Sin curación	Dañina
36	Asp30Asn RS1323103083 G>A GAT>TAT	36	GH Invasor	QX(2)+MD	Curado	Benigna
65	Asp30Asn RS1323103083 G>A GAT>TAT	33	MicroPrl	MD	Control	Benigna
66	Asp30Asn RS1323103083 G>A GAT>TAT	34	Prl Invasor	MD	Control	Benigna
70	Asp30Asn RS1323103083 G>A GAT>TAT	34	Prl Invasor	MD	Control	Benigna
75	Asp30Asn RS1323103083 G>A GAT>TAT	34	Macro NF	Qx	Control	Benigna
76	Asp30Asn RS1323103083 G>A GAT>TAT	25	Prl Invasor	MD+RT	Control	Benigna
77	Asp30Asn RS1323103083 G>A GAT>TAT	31	GH Invasor	QX+RT	Inconsistente	Benigna
78	Asp30Asn RS1323103083 G>A GAT>TAT	25	Prl Invasor	MD	Control	Benigna

*GH=Hormona de crecimiento Prl=Prolactinoma NF=No Funcional MD=Tratamiento Médico QX=Tratamiento Quirúrgico RT= Radioterapia

En cuanto a la región codificante del Exón 2 hemos encontrado:

- Glu46Lys polimorfismo RS 772580337 en los pacientes 1-8, 11-13, 16, 23, 29.
- Arg81Gln polimorfismo RS1178603157 en los pacientes 2,3,8,16,78. La mayoría de las bases la reportan como benigna.
- Glu84Lys polimorfismo RS267606543, paciente 29. Se ha reportado como probablemente dañina bases bioinformática en todas las bases revisadas.
- Tanto la variable Arg56Cys polimorfismo RS267706538 y Val77Met polimorfismo RS199531255 fueron reportadas inicialmente, pero resultaron normales mediante la comprobación con anti-sentido. Estas variantes han sido reportadas como dañinas en 3 base de datos y como benignas en otras 3.
- Mismo caso de Gly83Arg RS1338917074, reportada inicialmente pero al confirmar el anti-sentido resultó normal. Esta variante ha sido reportada en todas las bases la como probablemente dañina.
- Variante sinónima Lys66Lys RS1329510300 en el paciente 78.

NO. DE PACIENTE	POLIMORFISMO		EDAD AL DX	TAMAÑO TUMOR	TRATAMIENTOS UTILIZADOS	CONTROL	NATURALEZA
1	Glu46Lys	RS 772580337	20	GH Macro	QX+RT+MD	Inconsistente	Benigna
3	Glu46Lys Arg81Gln	RS 772580337 RS1178603157	17	Invasor NF	QX(3)+RT	Control	Benigna
4	Glu46Lys	RS 772580337	30	Invasor NF	QX(3)+MD+RT	Sin control	Benigna
5	Glu46Lys	RS 772580337	14	Micro NF	Sin tratamiento	Control	Benigna
6	Glu46Lys	RS 772580337	40	MacroNF	QX+RT	Control	Benigna
7	Glu46Lys	RS 772580337	30	ACTH	QX+RT+MD	Curación	Benigna
8	Glu46Lys Arg81Gln	RS 772580337 RS1178603157	26	MicroNF	MD+RT	Control	Benigna
11	Glu46Lys	RS 772580337	32	GH Invasor	QX(2)	Curada	Benigna
12	Glu46Lys	RS 772580337	30	Prl Invasor	QX+MD	Control	Benigna
13	Glu46Lys	RS 772580337	22	GH Invasor	QX(2)+MD+RT	Sin curación	Benigna
16	Glu46Lys Arg81Gln	RS 772580337 RS1178603157	25	Prl Invasor	MD	Control	Benigna
29	Glu46Lys Glu84Lys	RS 772580337 RS267606543	36	Prl Invasor	QX+MD	Curado	Benigna Pb Dañina
78	Arg81Gln Lys66Lys	RS1178603157 RS1329510300	25	Prl Invasor	MD	Control	Benigna Sinónima

*GH=Hormona de crecimiento Prl=Prolactinoma NF=No Funcional ACTH=Hormona Adeno Corticotropa MD=Tratamiento Médico QX=Tratamiento Quirúrgico RT= Radioterapia

Por último en la región codificante del exón 3 se encontró His120Pro polimorfismo 779779725, asociada a un claro cambio de estructura de la proteína en los pacientes 1,2 y 3. Se ha reportado como probablemente dañina en 5 bases de y como benigna en 1.

NO. DE PACIENTE	POLIMORFISMO		EDAD AL DX	TAMAÑO TUMOR	TRATAMIENTOS UTILIZADOS	CONTROL	NATURALEZA
1	His120Pro	779779725	20	GH Macro	QX+RT+MD	Inconsistente	Benigna
3	His120Pro	779779725	17	Invasor NF	QX(3)+RT	Control	Benigna

Expuesto en las tablas observamos la tendencia en los polimorfismos identificados como variantes benignas a un mayor control de la enfermedad diagnosticadas y en las variantes identificadas como malignas a la no curación ni control.

Discusión

El presente estudio trata sobre una serie de pacientes diagnosticados con adenoma hipofisario y edad menor de 40 años al momento del diagnóstico en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”, con una incidencia mayor en hombres (50.81%) con una edad media fue de 27.91 al momento del diagnóstico, con un mínimo de 8 años y un máximo de 40 años al momento del diagnóstico.

Son ya numerosos los estudios a nivel internacional que en general han reportado los efectos del AHR en las alteraciones de la glándula pituitaria asociada a desarrollo de adenomas hipofisarios. La corte más significativa de esta línea de investigación ha sido la reportada por Dali desde 2007, con una nueva publicación de 2010 que nos habla de la frecuencia con importancia estadísticamente significativa del tamaño tumoral ($p=0.0006$) en pacientes con mutaciones positivas contra mutaciones negativas. Los tumores que presentaron mutaciones en el gen AIP fueron adenomas productores de hormona de crecimiento, mixtos (hormona de crecimiento y prolactina), prolactinomas y adenomas no funcionantes; aproximadamente el 85% de las mutaciones encontradas fueron en adenomas productores de hormona de crecimiento y el 50% de los adenomas productores de hormona de crecimiento se encontraron sin evidencia de mutación, coincidiendo con el resto de la literatura publicada (40), en nuestra cohorte aún no existen datos significativos que apoyen una determinada predisposición del tipo de tumor que presente la mutación, pero si una marcada tendencia de los ADH GH a presentarla y a ser tumores invasores y de difícil control.

El síndrome de adenomas familiares aislados es descrito como uno de los espectros importantes en el apartado de adenomas familiares, Beckers en 2013 lo describe con una predominancia aproximada del 2% de los casos de Adenomas y el 20% de ellos asociados a las mutaciones del AIP. Describe en su corte que las mutaciones asociadas al AIP presentan tumores pituitarios de mayor tamaño, a menor edad con una predominancia en niños/adolescentes presentada tanto en ADH GH, ADH NF, Prolactinomas y ADH ACTH. Menciona también el tratamiento de estos casos como un reto en el cual se requiere todos los recursos disponibles para alcanzar un control.

En nuestra cohorte hasta el momento existe la sospecha de mutación en un 6.5% de la población estudiada a una edad media de 29.71 años. Es probable que la causa por la cual nuestros pacientes son de mayor edad que los reportados en la literatura mundial sea por las características del hospital donde se llevó a cabo el estudio el cual estrictamente solo trata pacientes mayores de edad y son esporádicos los casos menores de edad captados. Este sesgo podría eliminarse al realizar un estudio multicéntrico que hiciera de nuestra investigación un proceso más inclusivo.

Del tamaño y características tumorales encontramos que 22 (36.06%) eran macroadenomas y 32 (52.45%) tumores invasores al momento del diagnóstico; esto podría tener algún tipo de sesgo por la misma razón mencionada con anterioridad que son las características de nuestro centro, el cual es punto de referencia a nivel nacional para patologías de 3er nivel que no pueden ser tratadas en otros centros de atención por la dificultad y reto que implican.

En cuanto el tipo de tratamiento necesario, encontramos que cerca de la mitad (49.1%) de la corte requirió más de una modalidad de tratamiento, y de ellos el 14.7% múltiples cirugías para lograr que el 68.85% de los pacientes se encontraran en control o con criterios de curación.

Delapiazza et al[40] reportó su serie encontrando que los principales síntomas que presentaron los pacientes fueron disminución de la agudeza visual (31%), endocrinopatía (20%), hallazgo incidental (17.5%), cefalea (16%). En el presente estudio, muestra que los principales síntomas fueron: disminución de la agudeza visual en el 49.1 %, amenorrea en 29.78% y curiosamente un 29.78% de pacientes que debutaron previamente con apoplejía; situación más frecuente reportada con anterioridad en pacientes con adenomas con mutaciones genéticas.

Las mutaciones más frecuentes reportadas hasta la fecha en la literatura son c.019C>T (p.R304X), c.40C>T (p.Q14X), c.811C>T(p.R271W) y c.241C>T (p.R81X); cada una de ellas con un número no mayor a 40 casos (41,49). Hasta el orden de nuestra secuenciación ninguna de estas mutaciones ha sido comprobada en los pacientes hasta ahora estudiados.

Hay que recordar la importancia del factor epi-genético, la necesidad de validar los patrones mutacionales acorde a cada región, y por lo tanto como cada región y país debe tener sus propios estudios y parámetros de normalidad que dictaminen la epidemiología en cada uno de ellos. Como único antecedente en el país, se cuenta con un estudio en conjunto del grupo de centro médico con el INNN MVS sobre una cohorte en pacientes con acromegalia y su frecuencia de la mutación, reportando cifras similares a la frecuencia descrita en la literatura mundial. En este artículo se describen dos casos; el primero un joven paciente con síntomas de exceso de GH desde lo 14 años y una niña de 9 años con gigantismo, ambos identificados con la mutación c.910C[T (p.Arg304Ter), una mutación truncada bien conocida. Curioso comentar que la niña de 9 años tiene una hermana gemela la cual contaba también con la mutación más no con la clínica. Se reportan también en este artículo las mutaciones c.976_977insC (p.Gly326AfsTer), c.872_877del (p.Val291_Leu292del) y c.868A (T, p.Lys290Ter); hasta el momento ninguna de ellas identificadas en nuestros pacientes analizados (48). No existe aún una cohorte mexicana que hable sobre el efecto AHR por mutacione en AIP en adenomas no funcionales, prolactinomas y tumores productores de ACTH.

Conclusión

Se encuentra bien descrita la función del gen AIP, la cual giran alrededor de ser un receptor nuclear de participación múltiple y compleja dentro de la glándula pituitaria al regular el crecimiento fisiológico, división y disrupción de toxinas; por lo anterior se concluye que las variantes aberrantes del mismo participan en la tumorigénesis de los tumores hipofisarios.

La presencia o no de los polimorfismos encontrados en el gen AIP se ven claramente asociados a un cambio en el comportamiento de los tumores en pacientes con lesiones adenomatosas en la región selar, presentando repercusiones clínicas severas a menor edad y un control de la enfermedad que conlleva mayor grado de dificultad, considerados tumores agresivos. En nuestro estudio se identificó una prevalencia del 6% de la mutación en nuestra población.

Resulta importante identificar los pacientes portadores de la mutación, pues deberá repercutir en una modificación a las decisiones terapéuticas, quirúrgicas y de seguimiento de los mismos. Se pretende se utilice este criterio como un fundamento para la elección de técnicas de radiación más prontas, planes quirúrgicos como devastación tumoral y el uso o no de análogos de somatostatina, ajustando cada una de las opciones a los escenarios clínicos específicos, todo esto con la finalidad de brindar una mayor calidad de vida a los pacientes e incluso expandir el beneficio a las familias de los identificados proporcionando “screening” y consejo genético a los afectados.

Referencias

1. Cappabianca, P. and E. de Divitiis, *Back to the Egyptians: neurosurgery via the nose. A five-thousand year history and the recent contribution of the endoscope*. Neurosurg Rev, 2007. **30**(1): p. 1-7; discussion 7.
2. Artico, M., et al., *The contribution of Davide Giordano (1864-1954) to pituitary surgery: the transglabellar-nasal approach*. Neurosurgery, 1998. **42**(4): p. 909-11; discussion 911-2.
3. Grosvenor, A.E. and E.R. Laws, *The evolution of extracranial approaches to the pituitary and anterior skull base*. Pituitary, 2008. **11**(4): p. 337-45.
4. Lindholm, J., *A century of pituitary surgery: Schloffer's legacy*. Neurosurgery, 2007. **61**(4): p. 865-7; discussion 867-8.
5. Jane, J.A., Jr., et al., *Perspectives on endoscopic transsphenoidal surgery*. Neurosurg Focus, 2005. **19**(6): p. E2.
6. Hardy, J., [*History of pituitary surgery*]. Neurochirurgie, 2010. **56**(4): p. 358-62.
7. Dubourg, J., E. Jouanneau, and M. Messerer, *Pituitary surgery: legacies from the past*. Acta Neurochir (Wien), 2011. **153**(12): p. 2397-402.
8. Newey PJ, Gorvin CM, Cleland SJ et al (2013). *Mutant prolactin receptor and familial hyperprolactinemia*. N Engl J Med 369:2012-2020.
9. Preda, V, Korbonits, M Cudlip, S, Karavitaki, N. Grossan, A(2014) *Low rate of germline AIP mutations in patients with apparently sporadic pituitary adenomas before the age of 40: a single centre adult cohort*. European Journal of Endocrinology 171,659-666.
10. Ezzat s, Asa SL, Couldwell WT et al. (2004). *The prevalence of pituitary adenomas: a systemic review*. Cancer 101:613-619.
11. Melmed S (2011). *Pathogenesis of pituitary tumors*, Nat Rev Endocrinol 7:257-266.
12. Evans CO, Young AN, BrownMR et al (2001). *Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*. J Clin Endocrinol Metab 86: 3097-3107.
13. Clayton RN 1997 *New developments in the management of acromegaly. Should we achieve an absolute biochemical cure?* J Endocrinol 155 (Suppl 1s) 23-29.
14. Yamada s (2001). *Epidemiology of pituitary tumors. In diagnosis and management of Pituitary Tumors*, Human Press. Totawa.
15. Theodoros, D., et al., *Pituitary adenomas: historical perspective, surgical management and future directions*. CNS Oncol, 2015. **4**(6): p. 411-29.
16. Asa, S.L. and S. Ezzat, *The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas*. Endocr Rev, 1998. **19**(6): p. 798-827.
17. Guinto-Balazar, G., et al., [*Hypophyseal macroadenomas. A neurosurgical challenge*]. Cir Cir, 2003. **71**(5): p. 350-8.
18. Al-Brahim, N.Y. and S.L. Asa, *My approach to pathology of the pituitary gland*. J Clin Pathol, 2006. **59**(12): p. 1245-53.
19. Asa, S.L., et al., *Cell type-specific expression of the pituitary transcription activator pit-1 in the human pituitary and pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(5): p. 1275-80.
20. Lamolet, B., et al., *A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins*. Cell, 2001. **104**(6): p. 849-59.
21. Lamonerie, T., et al., *Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene*. Genes Dev, 1996. **10**(10): p. 1284-95.
22. Poulin, G., B. Turgeon, and J. Drouin, *NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6673-82.
23. Gill, G.N., et al., *Role of intrinsic protein tyrosine kinase in function and metabolism of the epidermal growth factor receptor*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1988. **53 Pt 1**: p. 467-76.

24. Day, R.N., et al., *Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene*. Mol Endocrinol, 1990. **4**(12): p. 1964-71.
25. Drolet, D.W., et al., *TEF, a transcription factor expressed specifically in the anterior pituitary during embryogenesis, defines a new class of leucine zipper proteins*. Genes Dev, 1991. **5**(10): p. 1739-53.
26. Scully, K.M. and M.G. Rosenfeld, *Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis*. Science, 2002. **295**(5563): p. 2231-5.
27. Frawley, L.S. and F.R. Boockfor, *Mammosomatotropes: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue*. Endocr Rev, 1991. **12**(4): p. 337-55.
28. Kontogeorgos, G., *Predictive markers of pituitary adenoma behavior*. Neuroendocrinology, 2006. **83**(3-4): p. 179-88.
29. Vidal, S., et al., *Ultrastructural features of apoptosis in human pituitary adenomas*. Ultrastruct Pathol, 2001. **25**(2): p. 85-92.
30. Thapar, K., et al., *Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody*. Neurosurgery, 1996. **38**(1): p. 99-106; discussion 106-7.
31. Gerdes, J., et al., *Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues*. J Pathol, 1992. **168**(1): p. 85-6.
32. Kontogeorgos, G., et al., *Morphologic changes of prolactin-producing pituitary adenomas after short treatment with dopamine agonists*. Acta Neuropathol, 2006. **111**(1): p. 46-52.
33. Aminoff. M et al (2012) Handbook of clinical Neurology. Volume 106, Pages 2-760.
34. Beckers A, Daly AF (2007). *The clinical, pathological and genetic features of familial isolated pituitary adenomas*. Eur J Endocrinol 157:371-382.
35. Leontiou CA, Gueorgiev M, van der Spuy J et al (2008). *The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab 93:2390-2401.
36. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis E, Makinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA (2006) *Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene*. Science 312:1228-1230.
37. Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, Chapple JP, Trivellin G, Gueorgiev M, Guegan K, Stals K, KhooB, Kumar AV, Ellard S, Grossman AB, Korbonits (2010). *Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families*. Hum Mutat 31; 950-960.
38. Yu R, Bonert V, Saporta I et al. (2006). *Aryl hydrocarbon receptor interacting protein variants in sporadic pituitary adenomas*. J Clin Endocrinol Metab 91: 5126-5129.
39. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis, et Al. (2006) *Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene*. Science 312; 1228-1230.
40. Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, et al. *Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations*. Proc. Nat. Acad. Sci. 104; 4101-4105.
41. Beckers E, Aaltonen L, Daly A, Karhu A (2013) Endocrine Reviews. April 2013, 34(2):239-277.
42. Daly AF, Vanbellinghen JK, Khoo SK et al (2007). *Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families*. J Clin Endocr Metab 92:1891-1896.
43. Lecoq AL, Kamenicky P, Guichon-Mantel A, Chanson P (2015) Nat. Rev. Endocrinol 11:43-54.
44. Hernandez-Ramírez L, Gabrovska P, Denes J, Stals K et al (2015). Jclin Endocrinol Metab. 100:1869.

45. Cazabat L, Bouligand J, Salenave S, Bernier M, et al (2012). *Germline AIP mutations in apparently sporadic pituitary adenomas: prevalence in a prospective single-center cohort of 443 patients*. J clin endocrinol metab. 97(4);664-670.
46. Cazabat L, Libé R, Perlemoine K, René-Corail F, Burnichon N et al (2007). *Germline inactivating mutations of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in a large cohort of sporadic acromegaly: mutations are found in a subset of young patients with macroadenomas*. Eur J Endocrinol. Jul 157(1):1-8.
47. Adrian F. Daly,* Maria A. Tichomirowa,* Patrick Petrossians,* et al (2010). *Clinical Characteristics and Therapeutic Responses in Patients with Germ-Line AIP Mutations and Pituitary Adenomas: An International Collaborative Study*. J Clin Endocrinol Metab, November 2010, 95(11):E373–E383
48. Ramírez-Rentería C ,Hernández-Ramírez L,, Portocarrero-Ortiz L et al (2016) *AIP mutations in young patients with acromegaly and the Tampico Giant: the Mexican experience* . Endocrine.
49. Formosa R, Vassallo J (2017) *The complex biology of the Aryl Hydrocarbon Receptor and its role in the pituitary gland*. Horm Canc 20 jun 2017.