



Universidad Miguel Hernández de Elche

Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Tesis Doctoral

**CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS
SOBRE LA BASE DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS**

Doctorando

MARÍA EUGENIA TORREGROSA QUESADA

Director de tesis

Antonio Picó Alfonso

Cordirectora de tesis

Araceli García Martínez

Diciembre, 2020

La tesis se presenta por compendio de publicaciones.

Las referencias de los artículos que constituyen la base de la tesis son las siguientes:

María Eugenia Torregrosa-Quesada, Araceli García-Martínez, Sandra Silva-Ortega, Sebastián Martínez-López, Rosa Cámara, Carmen Fajardo, Cristina Lamas, Ignacio Aranda, Antonio Picó. **How valuable is the RT- qPCR of Pituitary-Specific Transcription Factors for Identifying Pituitary Neuroendocrine Tumor Subtypes According to the New WHO 2017 Criteria?** *Cancers* 2019, 11(12), 1990; <https://doi.org/10.3390/cancers11121990>. Según el JCR (journal citation report) del 2019 es una revista con un factor de impacto de 6.162 y se sitúa en el primer cuartil.

María Eugenia Torregrosa-Quesada, Araceli García-Martínez, Ángel Sánchez-Barbie, Sandra Silva-Ortega, Rosa Cámara, Carmen Fajardo, Cristina Lamas, Ignacio Aranda, Antonio Picó. **The silent variants of pituitary tumors: demographic, radiological and molecular characteristics.** *J Endocrinol Invest.* 2021 Jan 21. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01468-2>. Según el JCR (*journal citation report*) del 2019 es una revista con un factor de impacto de 3.397 y se sitúa en el segundo cuartil.

D. Vicente Francisco Gil Guillén, Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZA:

La presentación y defensa como tesis doctoral del trabajo “CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS SOBRE LA BASE DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS” realizado por Dña. María Eugenia Torregrosa Quesada bajo la dirección del Dr. D. Antonio Miguel Picó Alfonso y la codirección de la Dra. Araceli García Martínez.

De acuerdo a la información recibida sobre las evaluaciones previas realizadas en cumplimiento de la normativa general vigente y la propia de la Universidad Miguel Hernández y según lo certificado por las personas que han realizado la tutoría y dirección, la tesis cumple los requisitos para proceder a su defensa pública.

En Sant Joan d’ Alacant, a veintiuno de octubre de 2020

VICENTE
FRANCISCO
O|GIL|
GUILLEN

Firmado digitalmente por
VICENTE
FRANCISCO|GIL|
GUILLEN
Fecha: 2021.03.16
15:05:13 +01'00'

Firmado: Prof. Vicente Francisco Gil Guillén

Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas



PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA, CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

Campus de Sant Joan d’ Alacant. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 Sant Joan d’ Alacant

Telf.: 96 5233755 c.electrónico: malmarcha@umh.es/



PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA, CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

D. Antonio Miguel Picó Alfonso, director y Dña. Araceli García Martínez, codirectora de la tesis doctoral titulada **“CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS SOBRE LA BASE DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS”**

CERTIFICAN:

Que Dña. María Eugenia Torregrosa Quesada ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS SOBRE LA BASE DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo en Sant Joan d’Alacant, a veintiuno de octubre de dos mil veinte.

Fdo. D. Antonio Miguel Picó Alfonso
Director de tesis

Fdo. Dña. Araceli García Martínez
Codirector de tesis



PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA, CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS
Campus de Sant Joan d’Alacant. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 Sant Joan d’Alacant
Telf.: 96 5233755 c.electrónico: malmarcha@umh.es/

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Picó, por darme la oportunidad de participar en este interesante proyecto, por su confianza y disponibilidad.

A la Dra Araceli García-Martínez, sin cuyo excelente trabajo no hubiera sido posible la realización de la tesis. Por estar disponible en cualquier momento día, todos los días. Ha sido un referente en capacidad de trabajo y esfuerzo continuo.

A mis compañeras del Laboratorio de Hormonas, incluida Rocío, por la ayuda prestada, especialmente a Victoria por su respaldo y generosidad intelectual.

A toda mi familia. A mis hijos, Daniel y Alicia, por el tiempo que les he robado, espero haberles servido de ejemplo de esfuerzo y dedicación, ya que nunca es tarde para aprender. A Vicente por su apoyo constante e incondicional.

A mi padre, ejemplo de integridad y honestidad, a él le dedico esta tesis. Siempre te voy a echar de menos.

Financiación

La colección de tumores hipofisarios del Biobanco del Hospital General Universitario de Alicante se creó gracias al proyecto Registro Español Molecular de Adenomas Hipofisarios (REMAH) bajo el auspicio de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN). La presente tesis ha contado con la ayuda concedida por la Fundación Juan Gil-Albert.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN Y ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
1. Patogénesis de los tumores neuroendocrinos hipofisarios (TH)	3
2. Líneas celulares y factores de transcripción.....	5
3. Clasificaciones de los TH	7
3.1 Clasificación clínica.....	7
3.2 Clasificación radiológica	8
3.3 Clasificación patológica de los TH: aportación de los estudios inmunohistoquímicos y moleculares	9
4. Mecanismos de silenciamiento tumoral	12
JUSTIFICACIÓN.....	15
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS.....	23
MATERIAL Y MÉTODO.....	27
1. Diseño	29
2. Ámbito del estudio	29
3. Pacientes y muestras	29
4. Variables del estudio	30
4.1. Variables demográficas	30
4.2. Variables clínicas	30
4.3. Variables bioquímicas	30

Tabla de Contenidos

4.4. Variables radiológicas.....	32
4.5. Variables moleculares	32
4.6. Variables inmunohistoquímicas	32
5. Técnicas moleculares.....	33
5.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc	33
5.2. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	34
5.3. Estudio de la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias	35
5.4. Estudio de la expresión génica de los factores de transcripción específicos de las hormonas hipofisarias	35
6. Técnicas inmunohistoquímica	36
7. Criterios de identificación de los diferentes subtipos de TH	37
7.1. Identificación molecular de acuerdo a la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias	37
7.2. Identificación inmunohistoquímica (IHQ) de acuerdo a la expresión proteica de las hormonas adenohipofisarias	38
7.3. Identificación molecular de acuerdo a la expresión génica de los factores de transcripción	39
7.4. Identificación IHQ de acuerdo a la expresión proteica de los factores de transcripción	39
8. Concordancia entre la identificación molecular e inmunohistoquímica de los subtipos de TH de acuerdo a la expresión génica o proteica de los factores de transcripción.....	40
9. Aspectos éticos	40
10. Análisis estadísticos	40

RESULTADOS.....	43
Artículo 1	45
1. Pacientes	45
2. Identificación y frecuencia de los subtipos de TH de acuerdo con la expresión de los genes y proteínas de las hormonas adenohipofisarias	47
3. Identificación y frecuencia de los distintos subtipos TH sobre la base del estudio molecular (RT-qPCR) e inmunohistoquímico de los factores de transcripción hipofisarios.....	49
3.1. Expresión génica de los factores de transcripción en los diferentes subtipos de TH	49
3.2. Expresión proteica y génica de los factores de transcripción en el subconjunto de 56 tumores.....	50
3.3. Frecuencia absoluta y relativa de los diferentes subtipos de TH según la expresión génica o proteica de los factores de transcripción ..	51
4. Concordancia entre identificación molecular e IHQ de los subtipos TH según los factores de transcripción en el subconjunto de la muestra.	53
5. Casos discordantes	54
Artículo 2	55
1. Características demográficas, clínicas y radiológicas en la serie completa (n=268 tumores).....	55
2. Frecuencia de los distintos subtipos de TH en la serie global identificados por los estudios inmunohistoquímicos y moleculares de las hormonas adenohipofisarias	56
3. Diferencias demográficas, clínicas y radiológicas entre los subtipos de TH funcionantes y silentes de acuerdo a su identificación IHQ	58

Tabla de Contenidos

4. Diferencias en la expresión de los genes de las hormonas adenohipofisarias entre los subtipos de TH funcionantes y silentes de acuerdo a su identificación IHQ.....	61
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	83
Futuras líneas de investigación	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	99
Anexo I: Tabla suplementaria Artículo 1.....	101
Anexo II: Tabla suplementaria Artículo 2.....	107
ARTÍCULOS	113
Artículo 1	115
Artículo 2	132

ABREVIATURAS

AVPR1B: gen receptor de arginina vasopresina 1B

CRHR1: gen receptor de la hormona liberadora de corticotropina 1

CT: tumor corticotropo o corticotropinoma

ESR1 (*ESR1*): factor de transcripción receptor de estrógeno 1 (gen)

FC: Fold Change

F-CT: tumor corticotropo funcionante o corticotropinoma funcionante

F-LT: tumor lactotropo funcionante o lactotropinoma funcionante

F-PH Pit-1: plurihormonal Pit-1 funcionante

F-ST Mixto: tumor somatotropo-lactotropo mixto funcionante

F-ST: tumor somatotropo funcionante o somatotropinoma funcionante

FT: Factores de transcripción

F-TT: tumor tirotrópico funcionante o tirotrópico funcionante

F-TPHU: tumor plurihormonal inusual funcionante

GATA2 (*GATA2*): factor de transcripción de unión a GATA 2 (gen)

GT: tumor gonadotropo o gonadotropinoma

IHQ: inmunohistoquímica

LT: tumor lactotropo o lactotropinoma

NEUROD1: gen de diferenciación neuronal 1

NFPA: tumor hipofisario no funcionante

PH Pit-1: tumor plurihormonal Pit-1

Pit-1 (*PIT-1*): factor de transcripción positivo específico de la hipófisis 1 (gen)

POMC: gen *proopiomelanocortina*

POMC: proopiomelanocortina

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

S-CT: tumor corticotropo silente o corticotropinoma silente

SF-1 (*SF-1*): factor esteroideogénico 1 (gen)

S-LT: tumor lactotropo silente o lactotropinoma silente

SPA: adenoma hipofisario silente

S-PH Pit-1: plurihormonal PIT-1 silente

Abreviaturas

S-ST Mixto: tumor somatotropo-lactotropo mixto silente

S-ST: tumor somatotropo silente o somatotropinoma silente

ST Mixto: tumor somatotropo-lactotropo mixto

ST: tumor somatotropo o somatotropinoma

S-TT: tumor tirotrópico silente o tirotrópico silente

S-TPHU: tumor plurihormonal inusual silente

TH: tumores neuroendocrinos hipofisarios

TN: tumor de células nulas o null cell

TPHU: tumor plurihormonal inusual

Tpit (*TBX19*): factor de transcripción hipofisario miembro de la familia Tbox (gen)

TT: tumor tirotrópico o tirotrópico

Resumen y Abstract

RESUMEN Y ABSTRACT

Resumen en inglés (abstract)

Artículo 1

The classification of pituitary neuroendocrine tumors (PitNET) subtypes continues generating interest. In 2017, the World Health Organization (WHO) proposed considering the immunohistochemical (IHC) analysis of pituitary-specific transcription factors (TF) for their typification. The present study targeted the quantification of pituitary-specific TF (*TPIT*, *PIT-1*, *SF-1*, *GATA2*, *ESR1*) gene expression by RT-qPCR to overcome the shortcomings of IHC and to complement it.

We analyzed 251 tumors from our collection of PitNET and performed additional IHC studies in a subset of 56 samples to analyze the concordance between gene and protein expression of the TF. The molecular and IHC studies allowed us to significantly reduce the percentage of null cell tumors in our series, most of which were reclassified as gonadotroph tumors. The concordance between the molecular and the immunohistochemical studies was good for tumors coming from the corticotroph and Pit-1 lineages but worsened for the rest of the tumors. Indeed, the RT-qPCR helped to improve the typification of plurihormonal Pit-1 and unusual tumors. Overall, our results suggest that the RT-qPCR of pituitary-specific TF and hormone genes could help pathologists, endocrinologists, and neurosurgeons to improve the management of patients with pituitary tumors.

Artículo 2

Neuroendocrine tumors of the anterior pituitary gland (PTs) are mostly benign tumors with a low prevalence, which has nevertheless increased with advances in brain radiology techniques. Nearly half of PTs are not associated with a clinical endocrine syndrome. These tumors have been indistinctly named non-functioning pituitary adenomas (NFPAs) or silent pituitary adenomas (SPAs). Therefore, the aims of the present study were to study the frequency and characterize the silent variant of PTs in a large local series PTs, and to assess their pituitary adenohypophyseal gene expression. This observational, cross-sectional study was performed in a Pituitary Tumor Center of Excellence and

Resumen y Abstract

involved 268 PTs. After identifying the different subtypes according to the immunohistochemical (IHC) expression of adenohipophyseal hormones, we studied their gene expression by RT-qPCR. We found that RT-qPCR complements the IHC typification of PT, reducing the proportion of null-cell PTs. In addition, silent tumors were larger and more invasive, but not more proliferative, than their functioning counterparts. Finally, some silent PT subtype variants showed lower specific adenohipophyseal hormone gene expression than their functioning counterparts, which may contribute to the absence of endocrine manifestations.

Resumen (castellano)

Artículo 1

La clasificación de los subtipos de TH continúa generando interés. En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso considerar el análisis inmunohistoquímico de los factores de transcripción específicos de la hipófisis para su tipificación. El objetivo de la presente línea de investigación fue la cuantificación de la expresión de los genes de los factores de transcripción específicos de la hipófisis (*TPIT*, *PIT-1*, *SF-1*, *GATA2*, *ESR1*) por RT-qPCR para superar las deficiencias de la IHQ y complementarla.

Se analizaron 251 tumores de una colección de TH y se realizaron estudios inmunohistoquímicos adicionales en un subconjunto de 56 muestras para analizar la concordancia entre la expresión génica y proteica de los factores de transcripción. Los estudios moleculares y de IHQ de los mismos permitieron reducir significativamente el porcentaje de tumores de células nulas en la serie, la mayoría de los cuales se reclasificaron como tumores gonadotropos. La concordancia entre los estudios moleculares e inmunohistoquímicos fue buena para los tumores que provienen de las líneas celulares corticotropas y Pit-1, pero empeoró para el resto de los tumores. De hecho, la RT-qPCR ayudó a mejorar la tipificación de los tumores plurihormonales Pit-1 y los plurihormonales inusuales.

En general, nuestros resultados sugieren que la RT-qPCR de los genes de los factores de transcripción específicos y de los genes de las hormonas adenohipofisarias podría ayudar a los patólogos, endocrinólogos y neurocirujanos a mejorar el tratamiento de los pacientes con tumores hipofisarios.

Artículo 2

Los tumores neuroendocrinos de la glándula hipofisaria anterior (TH) son en su mayoría tumores benignos con una baja prevalencia, que sin embargo ha aumentado con los avances en las técnicas de imagen cerebrales. Casi la mitad de los TH no asocia un síndrome endocrino clínico. Estos tumores se han denominado indistintamente adenomas hipofisarios no funcionantes (NFPA) o adenomas hipofisarios silentes (SPA). Los objetivos del presente estudio fueron estudiar la frecuencia y caracterizar las variantes silentes de los TH en una gran serie, y evaluar la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias. Este estudio observacional, transversal, se realizó en el Centro de Excelencia de Tumores Hipofisarios e involucró a 268 TH. Tras identificar los diferentes subtipos según la expresión inmunohistoquímica (IHQ) de las hormonas adenohipofisarias, estudiamos su expresión génica mediante RT-qPCR. Encontramos que la RT-qPCR complementa a la tipificación IHQ de los TH, reduciendo la proporción de tumores de células nulas. Además, los tumores silentes fueron más grandes y más invasivos, pero no más proliferativos, que sus homólogos funcionantes. Finalmente, algunas variantes silentes mostraron una menor expresión génica de la hormona adenohipofisaria específica que sus correspondientes variantes funcionantes, lo que puede contribuir a la ausencia de manifestaciones endocrinas.

Introducción

Los tumores adenohipofisarios (recientemente denominados tumores neuroendocrinos hipofisarios (TH)¹, representan el 10-15% de las neoplasias intracraneales². Si bien algunos tumores presentan una sintomatología prominente debida a la hipersecreción/hiposecreción hormonal y/o a los efectos compresivos, otros muestran un desarrollo lento e inespecífico que retrasa el diagnóstico, mientras que un tercer grupo permanece libre de síntomas y sólo se detectan de forma incidental (en estudios radiológicos o autopsias). Por todo ello, determinar de forma precisa su prevalencia e incidencia en la población general constituye un desafío.

Si bien han sido considerados previamente como poco prevalentes, su identificación ha aumentado de forma progresiva durante los últimos años de forma paralela a la mayor utilización de las técnicas de imagen y a la mayor calidad de las mismas, de forma que son cada vez más reconocidos como una enfermedad común³. Mientras que estudios anteriores a 1969 mostraban una incidencia anual de 1.85 por 100.000 habitantes⁴, los más recientes encuentran una tasa de prevalencia estimada en la población general del 16.7%⁵, una incidencia de 3.9 / 100,000 habitantes en países como Suecia⁶ e incluso de 115.57 / 100,000 en Islandia⁷. Afectan a ambos sexos y a cualquier edad, aunque varía dependiendo del subtipo ^{2,3}.

1. Patogénesis de los tumores neuroendocrinos hipofisarios (TH)

Los TH son tumores considerados benignos que se originan a partir de la expansión clonal de las células adenohipofisarias. Los mecanismos implicados en la génesis y progresión tumoral son desconocidos. Las hipótesis más recientes sobre la génesis tumoral de los TH sugieren que diversas alteraciones genéticas y epigenéticas podrían participar en el inicio y desarrollo de estas neoplasias⁸⁻¹⁰.

La evidencia sugiere que los tumores hipofisarios derivan de la expansión monoclonal de células somáticas mutadas. Respaldan esta evidencia varios hechos: los tumores se presentan bien circunscritos rodeados de tejido no hiperplásico normal, hay estudios que informan de la X inactivación y de la

Introducción

pérdida de heterocigosidad (LOH) a favor de la monoclonalidad, y presentan patrones de metilación no aleatorios⁸.

Las anomalías en la regulación del ciclo celular se consideran un evento crucial en la formación de tumores hipofisarios⁹. Entre los mecanismos subyacentes que contribuirían al inicio y la proliferación tumoral se incluyen factores tales como la alteración en las moléculas reguladoras del ciclo celular (ciclinas, quinasas dependientes de ciclina (CDK), IL-6), alteraciones en factores de crecimiento (TGF α , FGF) y sus receptores, y la expresión alterada de genes del ciclo celular^{9,11}.

Las mutaciones somáticas y especialmente de la línea germinal ocurren infrecuentemente⁹. Menos del 5% de los tumores hipofisarios son familiares, asociados a síndromes como el MEN1, complejo de Carney, adenomas hipofisarios familiares aislados (FIPA) y síndromes paraganglioma-adenoma hipofisario, en los que existe mutación germinal de los genes *menin*, *PRKARIA*, *CDKN1B*, *AIP* y *succinil deshidrogenasa* respectivamente¹². En los tumores esporádicos se han descrito mutaciones somáticas activadoras en los genes *GNAS* y *USP8* en tumores somatotropos y corticotropos respectivamente^{9,13}.

Por el contrario, las alteraciones epigenéticas son determinantes en la patogénesis de los TH. Se han identificado varias de estas alteraciones en la expresión génica como la pérdida de genes supresores tumorales (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *RB1*, *GADD45B*, *MEG3* entre otros), la activación de oncogenes (*PTTG* y *MAGEA3*) asociados con la señalización aberrante del factor de crecimiento, y la expresión alterada de genes modificadores del epigenoma (*DNMT3b*) y de genes reguladores de la transcripción (*HMGA2*)^{9,11,12,14,15}. Por otro lado se ha sugerido que cambios epigenéticos, como la hipermetilación del DNA, la modificación de histonas, los microRNA y los ARN largos no codificantes, juegan un papel fundamental en la génesis tumoral hipofisaria^{12,16,17}.

Por último, factores hormonales también podrían tener participación en la génesis tumoral⁹.

En la figura 1 se resumen los múltiples factores que pueden influir en la patogénesis de los tumores hipofisarios esporádicos.

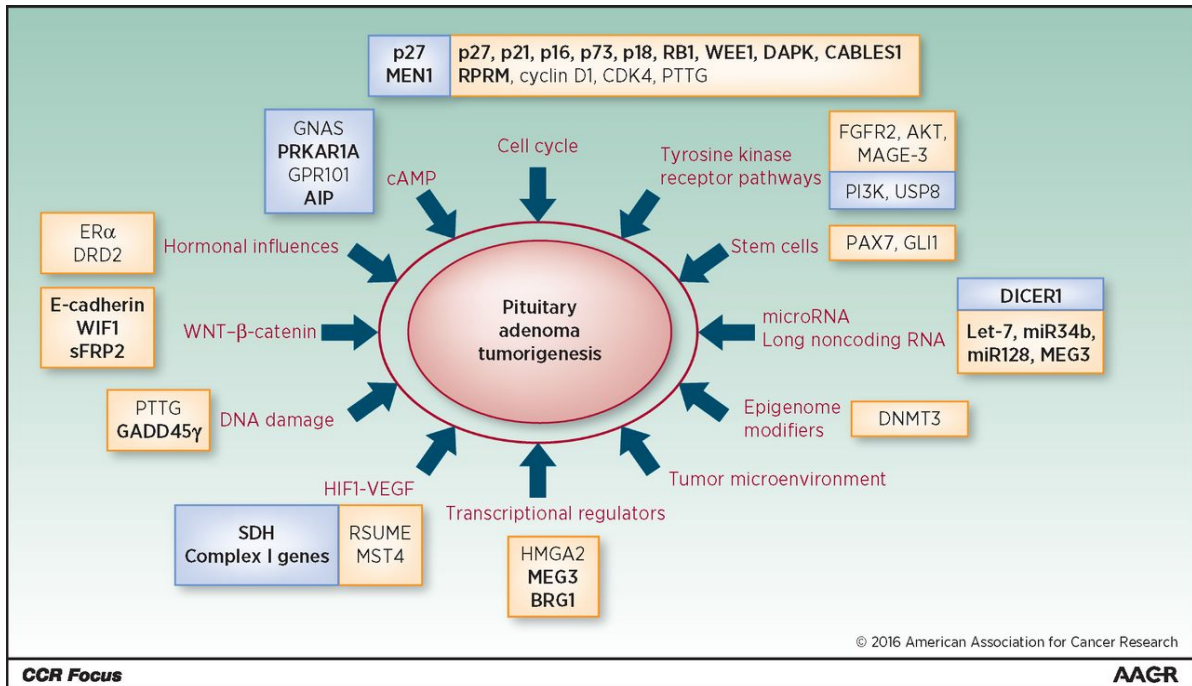


Figura 1: Múltiples vías de la génesis tumoral hipofisaria. Las vías, con ejemplos representativos, participan en la génesis tumoral debido a mutaciones (recuadros azules; los nombres de genes en **negrita** representan genes supresores, los nombres de genes que no están en **negrita** representan oncogenes) o la expresión génica alterada (recuadros naranjas). Tomada de Caimari F, Korbonits M. Novel Genetic Causes of Pituitary Adenomas ⁹.

2. Líneas celulares y factores de transcripción

Las células adenohipofisarias se desarrollan a partir de células primordiales de la cresta neural. Durante el desarrollo pituitario, determinados factores de transcripción son necesarios para el proceso de diferenciación de las células adenohipofisarias. La activación secuencial de estos factores da lugar a las células maduras en las que se expresan los genes de las hormonas adenohipofisarias ^{8,18}.

Las tres principales vías de diferenciación celular se muestran en la figura 2. De éstas derivan los cinco tipos de células altamente diferenciadas: somatotropas, gonadotropas, lactotropas, tirotropas, y corticotropas. Cada línea

celular podrá dar lugar a un subtipo de TH con características clínicas, inmunohistoquímicas y génicas específicas dependiendo de su origen

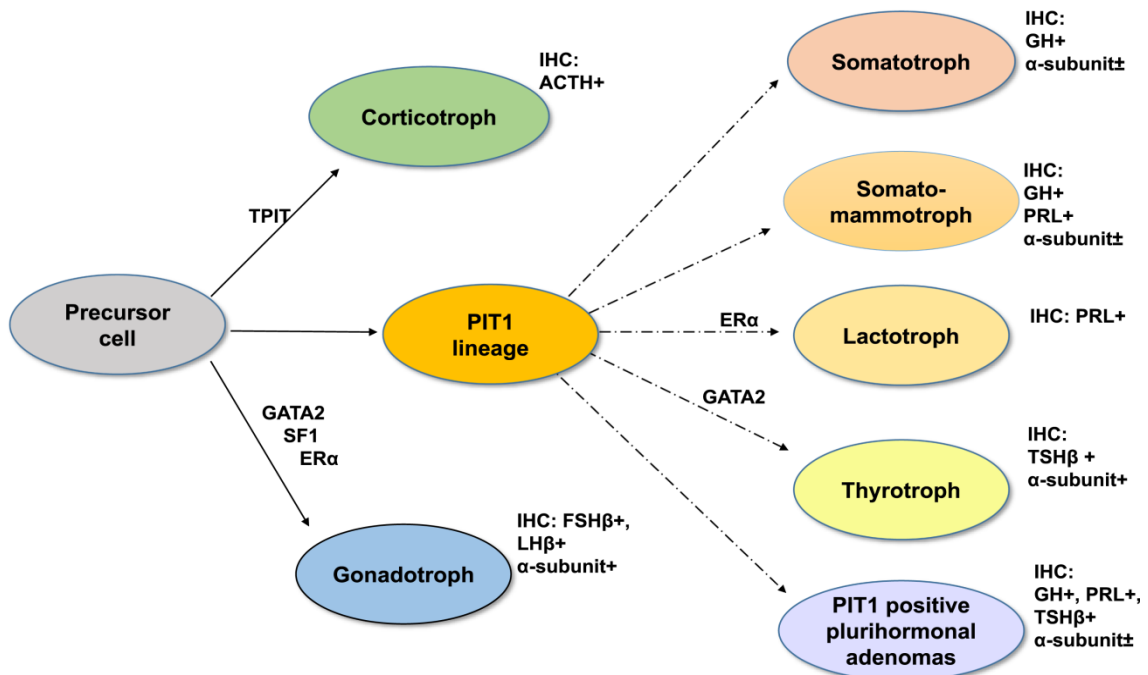


Figura 2: Vías principales de diferenciación celular y el perfil inmunohistoquímico de cada línea celular y del las células adenohipofisarias que de ellas derivan. GATA2, proteína de unión a GATA-2; PIT-1, POU clase 1 homeobox 1 (PUO1F1) o factor de transcripción positivo específico de la pituitaria 1; TPIT, factor de transcripción T-box 19 (TBX19). Modificado de Drummond et al18, <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00688>.

El estudio de los factores de transcripción específicos hipofisarios permite identificar la citogénesis de los tumores hipofisarios¹⁹. Así, el miembro de la familia Tbox TBX (Tpit), regula específicamente la expresión del gen proopiomelanocortina (*POMC*) en los tumores corticotropos (CT). Neurod1 contribuye a la diferenciación de los tumores secretores de corticotropina (ACTH) o CT, y de los tumores gonadotropos (GT)²⁰⁻²³. El factor esteroideogénico 1 (SF-1) se expresa en los GT. Finalmente, el factor 1 de transcripción específico de la hipófisis (Pit-1) actúa sinérgicamente con el receptor de estrógenos (ER) y, por otro lado, con la proteína de unión a GATA-2, para inducir la expresión de prolactina (PRL) y tirotropina (TSH), respectivamente²⁴⁻²⁶. Por tanto, Pit-1 se expresa en los tumores derivados de las líneas somatotropa (tumores somatotropos (ST)), lactotropa (tumores lactotropos (LT) y tirotrópica (tumores tirotropos (TT).

3. Clasificaciones de los TH

3.1. Clasificación clínica

Clínicamente los tumores se dividen en funcionantes, asociados a síntomas derivados de la producción de una o más hormonas, y en tumores hipofisarios no funcionantes (NFPA; acrónimo del inglés *non-functioning pituitary tumors*) o silentes, donde no existe evidencia clínica o bioquímica de exceso hormonal, aunque expresen hormonas o factores de transcripción por IHQ a nivel celular^{2,18,19,27}. Todos los subtipos de tumores funcionantes pueden tener una variante silente.

Las características clínicas de los tumores funcionantes están determinadas por la hormona específica hipersecretada. Los ST sobre-expresan GH, causando acromegalia en adultos y gigantismo en los niños. Los LT sobre-expresan PRL, y generalmente presentan amenorrea, infertilidad y galactorrea en las mujeres, e impotencia o infertilidad en los hombres. Los CT provocan hipersecreción de ACTH y enfermedad de Cushing. Los GT secretan hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) pero suelen asociarse a normo o hipofunción hipofisaria, aunque ocasionalmente puedan producir hipermenorrea o macroorquidismo. Los TT producen un hipertiroidismo clínico con concentraciones de TSH inapropiadamente normales o altas.

Por el contrario, los NFPA son TH que se manifiestan por síntomas/signos neurooftalmológicos relacionados con el crecimiento tumoral o derivados de la hiposecreción hormonal hipofisaria. Pueden cursar con hiperprolactinemia funcional por compresión de las vías dopaminérgicas y, ocasionalmente, pueden sufrir una necrosis tumoral (apoplejía hipofisaria) con hipopituitarismo agudo²⁸⁻³⁰. Pero cada vez con mayor frecuencia, son diagnosticados de forma incidental en pruebas de imagen sin que asocien manifestación clínica alguna.

Bajo el acrónimo NFPA, se han agrupado las variantes silentes de los TH de las cinco células adenohipofisarias, lo que ha sido motivo de elevada heterogeneidad de las series publicadas. Por tanto, es preferible utilizar, tras la cirugía y el análisis IHQ, el origen celular del tumor acompañado del término

silente, ie S-ST, S-CT. en confrontación con el término funcionante, ie F-ST, F-CT¹⁸.

Los tumores silentes (TS) son más invasivos y recurren con más frecuencia que sus homólogos funcionantes^{18,31}. De hecho, la clasificación de la OMS de 2017 destaca la importancia de reconocer los subtipos de tumores específicos que muestran un comportamiento agresivo, entre ellos el ST escasamente granuloso (con frecuencia silente), el CT silente y el tumor plurihormonal Pit-1 (anteriormente denominado adenoma silente del subtipo 3). Se diagnostican de forma tardía, con un pico máximo de frecuencia entre la cuarta y la octava década de la vida y no presentan una clara relación con el género, con datos ampliamente discordantes en la literatura^{6,7,30}.

La prevalencia de los TS es variable y dependiente de las series analizadas (quirúrgicas, autopsias o radiológicas). Suponen entre 14-54% de los adenomas hipofisarios, con una prevalencia estimada de 7- 41.3 casos por 100.000 habitantes y una tasa de incidencia estandarizada de 0.65 a 2.34 por 100.000 habitantes^{6,7,30,32}. Aún así, es probable que la verdadera prevalencia esté subestimada ya que muchos NFPA permanecen sin diagnosticar hasta que causan efecto masa.

3.2. Clasificación radiológica

Históricamente³³, los tumores hipofisarios se han dividido en micro (menos de 10 mm) y macroadenomas (más de 10 mm) en función de su mayor diámetro en las técnicas radiológicas. Adicionalmente, los TH pueden presentar extensión extraselar, hacia arriba en la cisterna supraselar, hacia abajo en el seno esfenoidal o lateralmente en los senos cavernosos.

En función del grado de invasión de los senos cavernosos en relación con la carótida intracavernosa, Knosp³⁴ propuso en el año 1993 una gradación de los TH en 4 niveles que continúa teniendo vigencia actualmente: el grado 0 representa la condición normal, el tumor no invade el seno cavernoso, no sobrepasa la línea tangente que une la pared medial de la arteria carótida interna supracavernosa con la carótida interna intracavernosa; en el grado 1 sobrepasa

esta línea tangente, pero la extensión no va más allá de una línea trazada entre los dos centros de ambas carótidas; en el grado 2 el tumor se extiende más allá de la línea intercarotídea, pero no más allá de la tangente lateral; en el grado 3 se extiende lateralmente a la línea tangencial lateral que une ambas carótidas; y el grado 4 corresponde al recubrimiento total de la arteria carótida intracavernosa. Los grados 0 y 1 de Knosp se consideran tumores no invasivos y los grados 2-4, tumores invasivos.

3.3. Clasificación patológica de los TH: aportación de los estudios inmunohistoquímicos y moleculares

La clasificación de los TH ha experimentado numerosos cambios dependiendo de la evolución de las técnicas de identificación de estos (figura 3). Con los años, la innovación tecnológica ha permitido la evolución desde una clasificación patológica tintorial (tres tipos: acidófilos, basófilos y cromófilos) y ultra-estructural (microscopía electrónica) a una clasificación IHQ, basada en el contenido hormonal de las células tumorales ³⁵. De esta forma, clásicamente se han identificado 5 subtipos principales de TH: tumores lactotropos (expresión IHQ de PRL), somatotropos (expresión IHQ de GH), corticotropos (expresión IHQ de ACTH), tirotropos (expresión IHQ de TSH) y gonadotropos (expresión IHQ de FSH, LH o subunidad alfa). Además, se han identificado TH plurihormonales (PH) (aquellos que expresan más de una hormona adenohipofisaria) y tumores nulos (TN) cuando no expresan IHQ ninguna hormona. Pese al avance que supuso la IHQ en la tipificación de los subtipos de TH, tiene la limitación de ser muy dependiente del observador y de los anticuerpos utilizados y de requerir una fijación óptima³⁶.

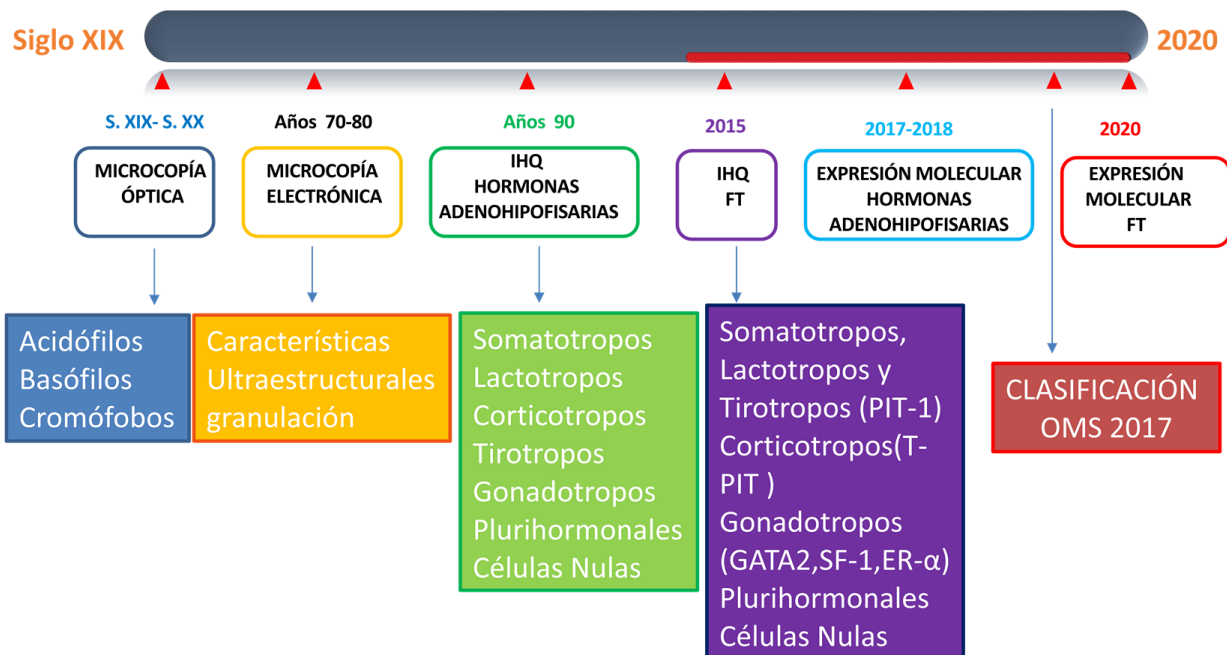


Figura 3. Identificación patológica de los TH a lo largo de la historia

Durante los últimos años los estudios moleculares se han ido integrando en los estándares de diagnóstico y tratamiento de los tumores. Mientras que, en tumores como el cáncer de mama, colon o pulmón, el estudio molecular es actualmente imprescindible para su tipificación y tratamiento, existe menos información en los tumores hipofisarios. Respecto al tratamiento los tumores hipofisarios sólo se ha evaluado el interés del silenciamiento del gen *MGMT* en la respuesta al tratamiento de los tumores agresivos con Temozolamida³⁷. Y tan sólo, 2 recientes publicaciones han demostrado el valor complementario del estudio de expresión molecular de las hormonas adenohipofisarias en la tipificación IHQ de los distintos subtipos de tumores hipofisarios^{38,39}. El estudio molecular de las hormonas adenohipofisarias ha permitido reclasificar algunos subtipos de tumores hipofisarios, específicamente los tumores nulos. Pero, pese a la clara reducción del porcentaje de tumores nulos en las series estudiadas respecto al estudio IHQ, la frecuencia de éstos continuaba siendo elevada.

Sin embargo, recientemente, Nishioka et al¹⁹ publicaron la aportación de la determinación IHQ de los factores de transcripción, Pit-1, Tpit y SF-1, en la identificación de los TH, mostrando una drástica reducción de los tumores nulos a expensas fundamentalmente de un aumento de la frecuencia de los gonadotropinomas. Los resultados de Nishioka fueron posteriormente confirmados en la mayor serie de tumores hipofisarios publicada hasta la fecha³.

A resultas de estos estudios, la cuarta edición de la OMS de la Clasificación de los tumores hipofisarios, recomienda explícitamente la determinación IHQ de los factores de transcripción hipofisarios además de la determinación de las hormonas adenohipofisarias⁴⁰. Se abandona pues, el concepto de “Adenoma productor de hormonas” sustituyéndose por una identificación de los TH basada en la línea celular de la que proceden, seguido de una categorización de las variantes histológicas de acuerdo con el contenido hormonal y a los hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos específicos. Como consecuencia, esta nueva clasificación utiliza la IHQ como la principal herramienta auxiliar para el diagnóstico, restringiendo el análisis ultra-estructural a casos muy concretos de tumores hipofisarios.

La clasificación reconoce siete subtipos principales de tumores hipofisarios: ST, LT y TT (todos de la línea celular PIT-1), CT (línea celular TPIT), GT (línea celular SF- 1), TN y Plurihormonales (PH) (PIT-1 o combinación variable de otros factores de transcripción) (Tabla 1).

Introducción

Tabla 1. Clasificación OMS 2017 de los TH⁴¹

Adenoma type	Morphological variants	Pituitary hormones and other immunomarkers	Transcription factors and other co-factors
Somatotroph adenomas	Densely granulated adenoma ^a	GH ± PRL ± α-subunit	PIT-1
	Sparsely granulated adenoma	GH ± PRL, [CK]	PIT-1
	Mammosomatotroph adenoma	GH + PRL (in same cells) ± α-subunit	PIT-1, ERα
	Mixed somatotroph-lactotroph adenoma	GH + PRL (in different cells) ± α-subunit	PIT-1, ERα
Lactotroph adenomas	Sparsely granulated adenoma ^a	PRL	PIT-1, ERα
	Densely granulated adenoma	PRL	PIT-1, ERα
	Acidophilic stem cell adenoma	PRL, GH (focal and variable)	PIT-1, ERα
Thyrotroph Adenoma		β-TSH, α-subunit	PIT-1
Corticotroph adenomas	Densely granulated adenoma ^a	ACTH, [CK]	T-PIT ^b
	Sparsely granulated adenoma	ACTH, [CK]	T-PIT ^b
	Crooke's cell adenoma	ACTH, [CK]	T-PIT ^b
Gonadotroph adenoma		β-FSH, β-LH, α-subunit (various combinations)	SF-1, GATA2, ERα
Null cell adenoma		None	None
Plurihormonal adenomas	Plurihormonal PIT-1 positive adenoma (previously called silent subtype 3 adenoma)	GH, PRL, β-TSH ± α-subunit	PIT-1
	Adenomas with unusual immunohistochemical combinations	Various combinations: ACTH/GH, ACTH/PRL	N/A

Es esperable que la aplicación de los factores de transcripción, cuantificados tanto por IHQ como por molecular, a la tipificación de los subtipos de TH, tal como recomienda la nueva clasificación de la OMS 2017, contribuya a una mejor identificación de estos, con implicaciones pronósticas y terapéuticas.

4. Mecanismos de silenciamiento tumoral

Los mecanismos de silenciamiento de los tumores hipofisarios no se conocen completamente. Si bien hay bastante información sobre los CT silentes^{21–23,42–45}, la información sobre el silenciamiento de otros subtipos de tumores hipofisarios es escasa.

Entre las teorías propuestas para explicar el por qué algunos CT no causan el síndrome de Cushing, se sugirió una autofagia de los gránulos de secreción de ACTH por lisosomas⁴². Los estudios de transcriptoma resaltan patrones de expresión alterados en varios genes en los TH en comparación con hipófisis normales^{20,43}. Se ha descubierto que los genes *POMC* y *TBX19* están sobre expresados en los CT funcionantes (F-CT) en comparación con los CT silentes (S-CT) y los NFPA²⁰, mientras que la alta expresión de *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico) se cree que está relacionado con la hipersecreción de ACTH. Otras hipótesis se centran en la alteración en el

procesamiento post-transcripcional de *POMC* y ACTH por las convertasas, de forma que la expresión defectuosa de la prohormona convertasa 1/3 podría conducir a la producción de variantes de ACTH biológicamente inactivas en los S-CT²¹. De hecho, nuestro grupo, recientemente, ha demostrado que la falta de actividad secretora de los S-CT estaba relacionada con un deterioro del procesamiento de *POMC* y una alta degradación de ACTH⁴⁴ al estudiar el procesamiento post-transcripcional de *POMC* y ACTH en 24 S-CT y 23 F-CT.

En los tumores somatotropos silentes (S-ST), si bien no se han estudiado profusamente los mecanismos de silenciamiento, se han propuesto algunas teorías para explicar la ausencia de síntomas de acromegalia, desde ausencia en la liberación de GH o defectos en el procesamiento post-transcripcional de GH^{46,47}, a la falta de actividad biológica de la GH secretada^{47,48}.

Por otro lado, estudios recientes han evaluado el papel de los cambios epigenéticos en la expresión génica diferencial de los tumores hipofisarios^{49,50} mostrando que los tumores silentes tienen niveles más altos de metilación del ADN en comparación con los funcionantes¹⁷. Siguiendo esta línea, Salomon et al (2018)¹⁰, integrando datos de metilación del ADN y de expresión génica, revelaron perfiles específicos de subtipo. Encontraron que la hipometilación de las regiones promotoras está relacionada con una mayor expresión de los genes *GH1* y *SSTR5* en tumores secretores de GH. Además encontraron una mayor expresión del gen *POMC* en los secretores de ACTH. Sin embargo, aunque algunos de estos estudios han asociado alteraciones epigenéticas con características clínico-patológicas, la utilidad clínica del perfil epigenético de estos tumores, altamente heterogéneo, sigue siendo poco conocida.

Justificación

La clasificación de la OMS 2017 de los TH recomienda la cuantificación IHQ de los diferentes factores de transcripción que participan en las vías celulares de síntesis de las hormonas adenohipofisarias. Sin duda el estudio de estos factores de transcripción permitirá una tipificación más precisa de los diferentes subtipos de TH con implicaciones pronósticas y terapéuticas, aportando un claro beneficio clínico.

Hasta la fecha pocos estudios han informado de la repercusión que la inclusión del estudio de los factores de transcripción ha tenido en el tratamiento de estos tumores debido en parte a su reciente incorporación y en parte a que la tinción IHQ de los factores de transcripción no está ampliamente disponible en todos los laboratorios. Además, es esperable que la IHQ de los factores de transcripción adolezca de las mismas limitaciones que la IHQ de las hormonas adenohipofisarias, es decir, subjetividad, dependencia del observador y de los anticuerpos empleados, y variabilidad inter-centros.

Por otra parte, los estudios moleculares se han integrado gradualmente en el diagnóstico y tratamiento clínico de los TH de forma similar a otros tumores. Publicaciones recientes han demostrado la contribución del estudio molecular de la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias a la tipificación de los TH, mostrando su papel complementario al estudio inmunohistoquímico, su aportación a la reclasificación de algunos subtipos, y destacando la solidez y elevada reproducibilidad del estudio molecular. De la misma forma es de esperar que el estudio molecular de los factores de transcripción específicos contribuya a una tipificación más precisa de los TH.

Finalmente, la identificación más precisa de los subtipos de TH permitirá identificar variantes silentes específicas de los subtipos tumorales que antes se agrupaban bajo el término inespecífico de tumores hipofisarios no funcionantes, favoreciendo una mejor comparación entre series. Por tanto, procede estudiar las diferencias clínicas, bioquímicas, radiológicas y moleculares de las variantes silentes de los TH en comparación con sus contrapartes funcionantes.

Por todo ello se han planteado las hipótesis de trabajo de la presente línea de investigación.

Hipótesis

Artículo 1

Hipótesis nula

La identificación de los subtipos TH sobre la base de la identificación molecular e IHQ de la expresión de los factores de transcripción de las líneas celulares hipofisarias no aportará mayor precisión a su identificación basada en el estudio molecular e IHQ de las hormonas adenohipofisarias.

Artículo 2

Hipótesis nula

No existen diferencias demográficas, radiológicas, bioquímicas ni moleculares (expresión génica) entre variantes silentes y sus contrapartes funcionantes.

Objetivos

Artículo 1

How valuable is the RT- qPCR of Pituitary-Specific Transcription Factors for Identifying Pituitary Neuroendocrine Tumor Subtypes According to the New WHO 2017 Criteria? *Cancers* 2019, 11(12), 1990; <https://doi.org/10.3390/cancers11121990>.

1. Objetivo primario:

Identificar y agrupar los TH de la colección de tumores hipofisarios del Biobanco del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA) de acuerdo a los nuevos criterios de la OMS 2017, mediante el estudio de:

- a) La expresión génica de los factores de transcripción específicos de las líneas celulares cuantificada por RT-qPCR.
- b) La expresión proteica de los factores de transcripción específicos de las líneas celulares cuantificada por IHQ.

2. Objetivos secundarios:

1. Cuantificar la frecuencia de los diferentes subtipos de TH de acuerdo a la identificación génica (RT-qPCR) y proteica (IHQ) de los factores de transcripción.
2. Comparar las frecuencias de los distintos subtipos de TH identificados sobre la base de la expresión génica y proteica de los factores de transcripción con respecto a las frecuencias de los mismos identificados sobre la base de la expresión génica y proteica de las hormonas adenohipofisarias.
3. Calcular la concordancia entre la identificación proteica (IHQ) y génica (RT-qPCR) de los factores de transcripción en un subconjunto de subtipos de TH.

Artículo 2

The silent variants of pituitary tumors: demographic, radiological and molecular characteristics. *J Endocrinol Invest* (2021).

1. Objetivo primario:

Cuantificar las diferencias de comportamiento entre las variantes silentes de los TH y sus contrapartes funcionantes.

2. Objetivos secundarios:

1. Comparar las características demográficas entre las variantes silentes y funcionantes de los distintos subtipos de TH.
2. Comparar las características radiológicas (tamaño y grado de invasión tumoral) entre las variantes silentes y funcionantes de los distintos subtipos de TH.
3. Comparar las características de proliferación entre las variantes silentes y funcionantes de los distintos subtipos de TH.
4. Comparar las diferencias en la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias específicas de cada subtipo de TH entre variantes funcionantes y silentes.

Material y Métodos

Este apartado unifica los apartados correspondientes de ambos artículos debido a la homogeneidad de los mismos.

1. Diseño

Estudio observacional transversal ambispectivo (retro y prospectivo).

2. Ámbito del estudio

Este estudio se ha desarrollado en el HGUA, centro de referencia en patología hipofisaria, dentro del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL) con la participación del Laboratorio de Apoyo a la Investigación (LAI) y los Servicios de Endocrinología, Análisis Clínicos, Neurocirugía y Anatomía Patológica.

El estudio se ha realizado en el contexto del Registro Molecular Español de Adenomas Hipofisarios (REMAH), un proyecto multicéntrico clínico-básico español.

La información clínica, bioquímica, patológica y radiológica de los pacientes se ha recogido de forma anónima de la base de datos REMAH 2.0, y de las propias bases de datos de los hospitales participantes en los casos no actualizados en la plataforma REMAH 2.0.

3. Pacientes y muestras

El estudio se ha realizado en 268 tumores hipofisarios con información clínica, bioquímica, radiológica e IHQ completa (ANEXO II). En estos 268 tumores se ha cuantificado la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias y se ha estudiado la existencia de diferencias en la expresión génica dependiendo de su funcionalidad. Complementariamente se han analizado las diferencias demográficas, clínicas, bioquímicas y radiológicas de los diferentes subtipos de TH y de sus variantes funcionantes y silentes.

Además, se ha estudiado la expresión génica de los factores de transcripción específicos de las hormonas adenohipofisarias en un subgrupo de 251 TH con material genético suficiente y de buena calidad. Además en un

Material y Métodos

conjunto de 56 tumores de este subgrupo se ha estudiado también la expresión proteica (IHQ) de los factores de transcripción.

Los análisis de expresión génica se han realizado sobre tejido tumoral procedente de las cirugías tras-esfenoidales. A partir de este tejido tumoral se ha extraído el material genético necesario para los estudios moleculares (metodología desarrollada más adelante). Las muestras de los tumores proceden de cuatro hospitales de referencia para cirugía hipofisaria (HGUA, Hospital Universitario de la Ribera, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, y Complejo Hospitalario de Albacete). El estudio inmunohistoquímico de las hormonas adenohipofisarias se ha realizado en los servicios de anatomía patológica de cada uno de los hospitales proveedores de muestras. El estudio inmunohistoquímico de los factores de transcripción se ha realizado exclusivamente en el HGUA. Todo el material procedente de estos tumores forma parte de la colección de tumores hipofisarios del Biobanco del HGUA, bajo el amparo de la normativa de biobancos.

4. Variables del estudio

4.1. Variables demográficas:

Sexo y edad al diagnóstico.

4.2. Variables clínicas:

Los tumores hipofisarios fueron clasificados en dos grupos, funcionantes o silentes, según la presencia o no de un síndrome clínico de hipersecreción hormonal asociado a características morfológicas de sobreproducción hormonal. Los tumores asociados a un síndrome endocrino específico (amenorrea-galactorrea, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipertiroidismo, etc) fueron catalogados como “tumores funcionantes”. Los correspondientes tumores hipofisarios que no manifestaban un síndrome endocrino específico fueron catalogados como las variantes “silentes” de los tumores funcionantes.

4.3. Variables bioquímicas:

El estudio hormonal incluyó la medición de: la hormona de crecimiento (GH), el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), la prolactina (PRL), el cortisol,

la corticotropina (ACTH), la tirotropina (TSH), la tiroxina libre (FT4), la hormona foliculo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH).

Durante el periodo de estudio al paciente se le extrajeron varias muestras de sangre mediante venopunción convencional para la evaluación hormonal, utilizando tubos de recolección sin anticoagulante con gel separador para la obtención de suero y tubos con anticoagulante, ácido etildiaminotetraacético (EDTA), para la obtención de plasma. Todas las muestras fueron extraídas a la misma hora del día (8:30-9:00 am). A su llegada al laboratorio, las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos, y fueron procesadas dentro de las dos horas de la extracción, o almacenadas a -20 °C para su posterior análisis. Las muestras de plasma fueron recogidas en un tubo de EDTA previamente enfriado, transportado al laboratorio sobre hielo y congeladas tras la separación, para la medición de ACTH.

Se cuantificaron la PRL, el cortisol, la TSH, y la FT4, mediante un método de inmunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA). Se midieron en suero en un autoanalizador automatizado Cobas e 801 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La ACTH se midió en plasma en el mismo analizador. La GH se midió en un analizador Immulite® (Siemens Diagnostics; Marburg, Alemania) (Siemens Medical Solutions Diagnostics Limited, Glyn Rhonwy, Llanberis, Reino Unido) y el IGF-1 en el analizador Liaison® (DiaSorin, Inc, Stillwater, MN, EE.UU.) ambos por inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA).

Los valores de referencia séricos/plasmáticos de las distintas hormonas, son los siguientes: GH: 0.0-0.5 ng/mL; IGF-1: 96.4-227.8 ng/mL (rango dependiente de la edad y sexo); PRL: 4,6-21 ng/mL; cortisol: 8.0-25.0 µg/dL; ACTH: 9.0-52.0 pg/mL; TSH: 0.38-4.84 mU/L y FT4: 0.8-2.0 ng/dL.

Todas las magnitudes hormonales cumplían las especificaciones de calidad establecidas por el laboratorio según las recomendaciones de las Sociedades Científicas Nacionales. El Servicio de Análisis Clínicos está certificado por Bureau Veritas según la Norma Internacional ISO 9001:2015.

Material y Métodos

4.4. Variables radiológicas:

Se seleccionaron las siguientes variables radiológicas de acuerdo con los objetivos del estudio:

a) Tamaño tumoral: el tamaño del tumor se definió como el mayor diámetro observado en la resonancia magnética. Los tumores con un diámetro < 10 mm fueron clasificados como microadenomas, y aquellos con un diámetro ≥ 10 mm como macroadenomas.

b) Invasión: la invasión se definió de acuerdo con la clasificación de Knosp, y se basó en la presencia o no de invasión del seno cavernoso. Los tumores con grados 0-I de Knosp fueron clasificados como no invasivos y los tumores con grados II-IV como invasivos.

4.5. Variables moleculares:

Se estudió la expresión molecular de:

a) Genes de las hormonas adenohipofisarias: hormona de crecimiento (*GH*), hormona folículo estimulante (*FSH*), hormona luteinizante (*LH*), prolactina (*PRL*), tirotropina (*TSH*), receptor de la vasopresina (*AVPR1b*), receptor 1 de la hormona liberadora de la corticotropina (*CRHR1*) y proopiomelanocortina (*POMC*) (gen que codifica la ACTH)

b) Genes de los factores de transcripción: *TPIT*, *NEUROD1*, *PIT-1*, *GATA2*, *ESR1* y *SF1*.

4.6. Variables inmunohistoquímicas:

Se estudió la expresión proteica de:

a) Las hormonas adenohipofisarias: GH, FSH, LH, PRL, TSH.

b) Los factores de transcripción: Tpit, Pit-1 y SF-1.

5. Técnicas moleculares

Todos los estudios moleculares se centralizaron en el LAI del HGUA-ISABIAL.

5.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Todas las muestras se conservaron inmediatamente después de la cirugía en solución estabilizadora de RNAlater® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a 4° C durante 24 horas y luego se almacenaron a -20°C.

La extracción de ARN se llevó a cabo de forma manual con el kit AllPrep DNA-ARN-Protein (Qiagen) previa desintegración de la muestra en el TissueLyser (Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración y pureza del ARN se midió en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific; Waltham, MA, EE.UU.). Retrospectivamente en el sistema 4200 TapeStation (Qiagen) se evaluó la integridad del ARN en un subconjunto de 96 muestras (no en la serie completa por la falta de suficiente material dado el pequeño tamaño de estos tumores). El 79.2% de las muestras mostraron un Número de Integridad de ARN (RIN) superior a 6 en comparación con el 15.6% de las muestras que mostraron un RIN inferior a 6; el 5.2% de las muestras no pudieron ser evaluadas. El sesgo eventual introducido por un ARN de baja calidad se superó mediante el uso de muestras procedentes de tejidos congelados y almacenados en RNAlater (que evita la degradación del ARN), junto con el uso de un kit de extracción optimizado que ofrece resultados óptimos en todas las aplicaciones posteriores, incluidos el análisis RT -qPCR, además de la normalización frente a dos genes de referencia, y el uso de un tamaño de amplicón corto.

El ARN de cada una de las muestras se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) para la realización de la RT-qPCR. Para cada reacción de retrotranscripción se utilizó una cantidad total de 2 µg de ARN en un volumen total de 20 µL. Para esta retrotranscripción se empleó el kit High- Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) el cual usa la transcriptasa reversa MultiScribe™. Las condiciones para el termociclador fueron: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C y, finalmente, se mantuvo a 4°C.

5.2. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La RT-qPCR consiste en la amplificación exponencial selectiva de una región de interés del ADN, con la utilización de sondas fluorescentes específicas que se unen al fragmento a amplificar. Estas sondas generan fluorescencia al separarse de la secuencia complementaria por la actividad exonucleasa de la polimerasa. La cantidad de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de PCR será exponencialmente proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.

En el estudio se realizó RT-qPCR siguiendo las instrucciones del fabricante en el sistema de Quant Studio 12K (Life Technologies, CA, EE. UU.) usando análisis basados en sondas de hidrólisis, y los resultados se analizaron con el software SDS (Applied Biosystems®). Los ensayos seleccionados se describen en los apartados siguientes.

El volumen total por reacción fue de 10 μ L: 5 μ L de master mix, 1 μ L de producto RT-PCR, 0,5 μ L de sonda de hidrólisis y 3,5 μ L de agua libre de nucleasas. Las condiciones de RT-qPCR fueron: 2 minutos a 50°C, 20 segundos a 95°C (activación de polimerasa) y 40 ciclos de PCR (1 segundo a 95°C más 20 segundos a 60°C).

Un pool de ARN de muestras de hipófisis normal procedente de autopsias (mezclada a partes iguales) se utilizó como calibrador. Todas las muestras y las muestras de autopsia de hipófisis normales fueron analizadas por duplicado y siguiendo el mismo protocolo.

Las diferencias relativas en la expresión génica fueron expresadas como unidades de cambio de veces o Fold Change (FC) y se obtuvieron con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (SDS software, Applied Biosystems). Se establecieron los rangos de expresión de cada gen con los percentiles 25 y 75. Se consideró como expresión dominante un Fold Change (por qRT-PCR) de un gen hormonal específico de la hipófisis por encima del percentil p25, es decir, el p25 de la expresión génica de *GH* en pacientes con acromegalia clínicamente activa.

5.3. Estudio de la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias

Se cuantificó la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias mediante RT-qPCR: *GH*, *FSH*, *LH*, *PRL*, *TSH*, *AVPR1b*, *CRHR1* y *POMC*, en todos los tumores.

El estudio se realizó en dos fases. La primera serie de tumores (133 de los 268) se analizó con primers SYBER Green. La segunda serie (135 de los 268) se estudió con sondas de hidrólisis (TaqMan Gene Expression Assays, Life Technologies, CA, EE.UU). Se decidió el cambio de las sondas SYBER Green por ser de diseño más costoso, menos específicas y validadas únicamente para investigación no para diagnóstico, y aunque el análisis molecular se realizó con dos métodos diferentes (primers SYBR Green vs sondas TaqMan), este hecho no afectó al estudio ya que se ha demostrado una buena correlación de ambas técnicas con el diagnóstico clínico³⁹.

Se seleccionaron las siguientes sondas SYBR Green de diseño propio: *GH*, *FSHB*, *LHB*, *TSHB*, *PRL*, *POMC*, *AVPR1B* y *CRHR*.

Se seleccionaron las siguientes sondas TaqMan: *GH* (1573905 A6), *FSHB* (Hs00174919_m1), *LHB* (Hs00751207_s1), *TSHB* (Hs02759015_s1), *PRL* (Hs00168730_m1), *POMC* (Hs01596743_m1), *AVPR1B* (Hs00949767_m1) y *CRHR1* (Hs00366363_m1).

Se emplearon los siguientes genes de referencia: *PGK1* (Hs00943178_g1), *TBP* (Hs00427620_m1) y *MRPL19* (Hs00608519_m1).

5.4. Estudio de la expresión génica de los factores de transcripción específicos de las hormonas hipofisarias

Se cuantificó la expresión génica de los principales factores de transcripción mediante RT-qPCR: *TPIT*, *NEUROD1*, *PIT-1*, *GATA2*, *ESR1* y *SF-1*.

Para la realización de la RT-qPCR se utilizaron dos sondas diferentes, ambas del mismo tipo y dirigidas a las mismas regiones de los genes, pero se decidió el cambio por un menor coste económico de las segundas:

Material y Métodos

a) TaqMan Fast Advanced PCR Master Mix y ensayos basados en sondas de hidrólisis (TaqMan Gene Expression Assays, Life Technologies).

Se seleccionaron los siguientes ensayos: *TPIT* (Hs00193027_m1), *NEUROD1* (Hs01922995_s1), *PIT-1* (Hs00230821_m1), *GATA2* (Hs00231119_m1), *ESR1* (Hs01046816_m1) y *SF-1* (Hs01124). Como genes endógenos se seleccionaron *PGK1* (Hs00943178_g1) y *TBP* (Hs00427620_m1).

b) PrimeTime Gene Expression Master Mix y ensayos basados en sondas de hidrólisis (PrimeTime Standard qPCR Assay, IDT).

Se seleccionaron los siguientes ensayos: *TPIT* (Hs.PT.58.26777525), *NEUROD1* (Hs.PT.58.38524795), *PIT-1* (Hs.PT.58.3315301), *GATA2* (Hs.PT.58.961996), *ESR1* (Hs.PT.58.14846478) y *SF-1* (Hs.PT.58.4383285). Como genes endógenos se seleccionaron *PGK1* (Hs.PT.58.27790011) y *TBP* (Hs.PT.58.19489510).

6. Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas fueron realizadas sobre matrices de tejido (TMAs) de forma automatizada con equipo Omnis (Dako-Agilent), con sistema de visualización de alta sensibilidad Envision® (Dako-Agilent). Para ello se tomaron muestras de dos cilindros de parafina de un milímetro de cada tumor para construir un bloque usando un dispositivo de tejido de matriz (instrumentos de Beecher). Cada bloque incluyó 20 casos más 2 controles.

Para el estudio las TMAs se expusieron a un panel de anticuerpos contra las siguientes hormonas hipofisarias: GH (Polyclonal, Novocastra), PRL (Polyclonal Rabbit Anti-Human Prolactin DAKO A0569), ACTH (Monoclonal Mouse Anti- ACTH Clone 02A3 – M3501 DAKO), FSH (Monoclonal Mouse Anti-Human FSH Clone C10 – M3504 DAKO), LH (Monoclonal Mouse Anti-Human LH Clone C93 – M3502 DAKO) y TSH (Monoclonal Mouse Anti-Human TSH Clone 0042 – M3503 DAKO).

La valoración de cada anticuerpo se realizó tras digitalización total de las preparaciones en alta resolución con escáner Ventana iScan HT (Roche) aplicando un software de cuantificación, en monitores fullHD.

Se estimó la proliferación celular mediante la cuantificación IHQ del índice de tinción MIB1-LI/Ki-67. La cuantificación con Ki-67 se realizó en secciones completas sobre dos puntos de mayor actividad (“hot spots”), cuantificando en cada punto al menos 500 células y considerando positivo cualquier intensidad de tinción nuclear. El resultado se expresó en porcentaje, considerando alta proliferación un Ki67 $\geq 3\%$ ⁵¹.

La aplicación de las técnicas IHQ se realizó por igual en los cuatro hospitales.

Para el estudio de la expresión proteica de los factores de transcripción en el subgrupo de 56 tumores, las TMAs se expusieron a un panel de anticuerpos contra los siguientes factores de transcripción de las líneas celulares hipofisarias: Pit-1 (ThermoFisher PA5-59662), SF1 (abcam ab217317) y Tpit (abcam ab243028).

La cuantificación de la inmunotinción fue realizada por tres observadores en un microscopio Multivisión.

7. Criterios de Identificación de los diferentes subtipos de TH

7.1. Identificación molecular de acuerdo a la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias.

Se identificaron los diferentes subtipos de TH sobre la base de la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias de acuerdo con los criterios publicados previamente por nuestro grupo³⁹.

La identificación de los subtipos tumorales se basó en el gen/genes predominantemente expresado/s:

1) *POMC*, *AVPR1B* y *CRHR1* para CT

Material y Métodos

- 2) *GH* para ST y *GH-PRL* para ST mixtos o mamosomatotropos
- 3) *PRL* para LT
- 4) *TSH* para TT
- 5) *FSH-LH* para GT

En los casos con expresión dominante de varios genes de estirpes diferentes, se clasificó el tumor como plurihormonal inusual (PHU) y cuando no hubo ninguna expresión de los genes estudiados, se consideró el tumor como nulo (TN).

7.2. Identificación inmunohistoquímica (IHQ) de acuerdo a la expresión proteica de las hormonas adenohipofisarias.

En todos los casos (268 tumores) se realizó inmunotinción frente a las hormonas adenohipofisarias anteriormente numeradas.

La identificación se basó en la positividad de la inmunotinción a:

- 1) ACTH para CT
- 2) GH para ST y GH-PRL para ST mixtos o mamosomatotropos
- 3) PRL para LT
- 4) TSH para TT
- 5) FSH-LH para GT

El criterio utilizado para la identificación de los diferentes subtipos de TH en función de sus características IHQ fue dependiente de cada hospital:

1. Porcentaje de inmunorreactividad de las células: 3 => 67% de células positivas; 2 = 34–66% de células positivas; 1 = 5-33% de células positivas; y 0 = 0- <5% de células positivas.
2. Clasificación semicuantitativa: 3 = +++, 2 = ++, 1 = +, 0 = 0.

Se consideró como diagnóstico una inmunopositividad de una proteína hormonal específica de la hipófisis de más del 5% o mayor o igual de 2 ++.

7.3. Identificación molecular de acuerdo a la expresión génica de los factores de transcripción.

En un subgrupo de 251 tumores de la muestra completa, se cuantificó la expresión génica mediante RT-qPCR de los principales factores de transcripción relacionados con las tres líneas celulares hipofisarias anteriormente mencionados.

La identificación de los subtipos de tumores se basó en el gen/genes dominantes expresado/s de uno o más factores de transcripción:

- 1) *TPIT* para CT
- 2) *PIT-1* y *GATA2* para tumores de la línea celular PIT-1
- 3) *GATA2* y *SF-1* para GT

Cuando hubo expresión dominante de genes de más de un linaje de células pituitarias, se clasificó el tumor como PHU y cuando no hubo ninguna expresión de los genes estudiados, se consideró el tumor como TN.

7.4. Identificación IHQ de acuerdo a la expresión proteica de los factores de transcripción.

Se estudió simultáneamente en el subconjunto de 56 tumores (previamente diagnosticados de acuerdo a los criterios de clasificación de la OMS 2004) la expresión proteica de los factores de transcripción *Tpit*, *Pit-1* y *SF-1* por IHQ. La identificación de los subtipos de tumores se basó en la inmunotinción:

- 1) *Tpit* para CT
- 2) *Pit 1* para los de la línea celular PIT 1
- 3) *SF-1* para GT

Se consideró diagnóstico de expresión proteica una inmunopositividad para el factor de transcripción específico > 5% por IHQ.

Los factores de transcripción GATA2, NEUROD1 y ESR1 no fueron cuantificados por IHQ.

8. Concordancia entre la identificación molecular e inmunohistoquímica de los diferentes subtipos de TH de acuerdo a la expresión génica o proteica de los factores de transcripción

Una vez que se identificaron los diferentes subtipos de TH de acuerdo con la expresión de genes y proteínas de los factores de transcripción estudiados en el subconjunto de 56 pacientes, se calculó la concordancia entre la identificación molecular e IHQ (coeficiente kappa).

9. Aspectos éticos

El estudio cumple con la Declaración de Helsinki y otras leyes aplicables y ha recibido la aprobación del comité de ética local (CEIm número de referencia: PI2018/127, fecha: 08 Octubre 2018, Hospital General Universitario de Alicante, Referencia ISABIAL: 180361). El material biológico utilizado en este estudio procede del Biobanco ISABIAL, previa obtención del consentimiento informado de cada paciente. Dicho consentimiento permite el almacenamiento del material excedente de diagnóstico, así como de la información clínica asociada, para su utilización en proyectos de investigación del área. No se consideró la perspectiva de género por cuanto que se trabajó sobre una colección previamente recogida pero sí se han realizado comparaciones del comportamiento tumoral por sexo.

10. Análisis estadístico

Las variables cualitativas (incluidos los subtipos de TH) se expresaron como frecuencias absolutas y relativas. La edad y el diámetro tumoral se expresaron como media \pm desviación estándar. Se determinó la distribución de las variables cuantitativas como paramétricas o no paramétricas (prueba de Shapiro-Wilk). La relación entre las variables demográficas (edad, sexo), y

clínicas (tumor funcionante vs tumor silente) con las variables moleculares (fold change (FC)), se analizaron mediante los test T-Student, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, o Chi cuadrado según correspondió. La concordancia entre la IHQ y la identificación molecular de los diferentes subtipos de TH se calculó mediante el coeficiente kappa de Cohen ($\kappa = 1$ representando concordancia completa y $\kappa \leq 0$ concordancia nula). Se calculó la media del FC para elaborar las figuras. Se consideraron valores de p inferiores a 0.05 como estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 24.0 (IBM Software; Universidad Miguel Hernández, Alicante, España). Las figuras se elaboraron con el programa GraphPad Prism.

Resultados

Los resultados de la presente investigación están recogidos en las distintas publicaciones que se muestran en los anexos.

ARTÍCULO 1

María Eugenia Torregrosa-Quesada, Araceli García-Martínez, Sandra Silva-Ortega, Sebastián Martínez-López, Rosa Cámara, Carmen Fajardo, Cristina Lamas, Ignacio Aranda, Antonio Picó. **How valuable is the RT- qPCR of Pituitary-Specific Transcription Factors for Identifying Pituitary Neuroendocrine Tumor Subtypes According to the New WHO 2017 Criteria?**. *Cancers* 2019, 11(12), 1990; <https://doi.org/10.3390/cancers11121990>. Factor de impacto: 6.162. **Q1**.

1. Pacientes

Estudiamos la expresión génica de los factores de transcripción de las líneas celulares hipofisarias en 251 TH previamente categorizados en subtipos de acuerdo con su perfil de expresión génica dominante de las hormonas adenohipofisarias (Figura 1). Ciento sesenta y ocho TH eran tumores silentes, de los cuales 41 eran TN y 71 GT. Además, se estudió la expresión proteica por IHQ de los factores de transcripción en un subconjunto de 56 tumores, 9 de los cuales eran tumores TN y 19 GT. El resto de tumores silentes incluyeron CT, TT, ST, LT, PH Pit-1 y TPHU silentes.

Resultados

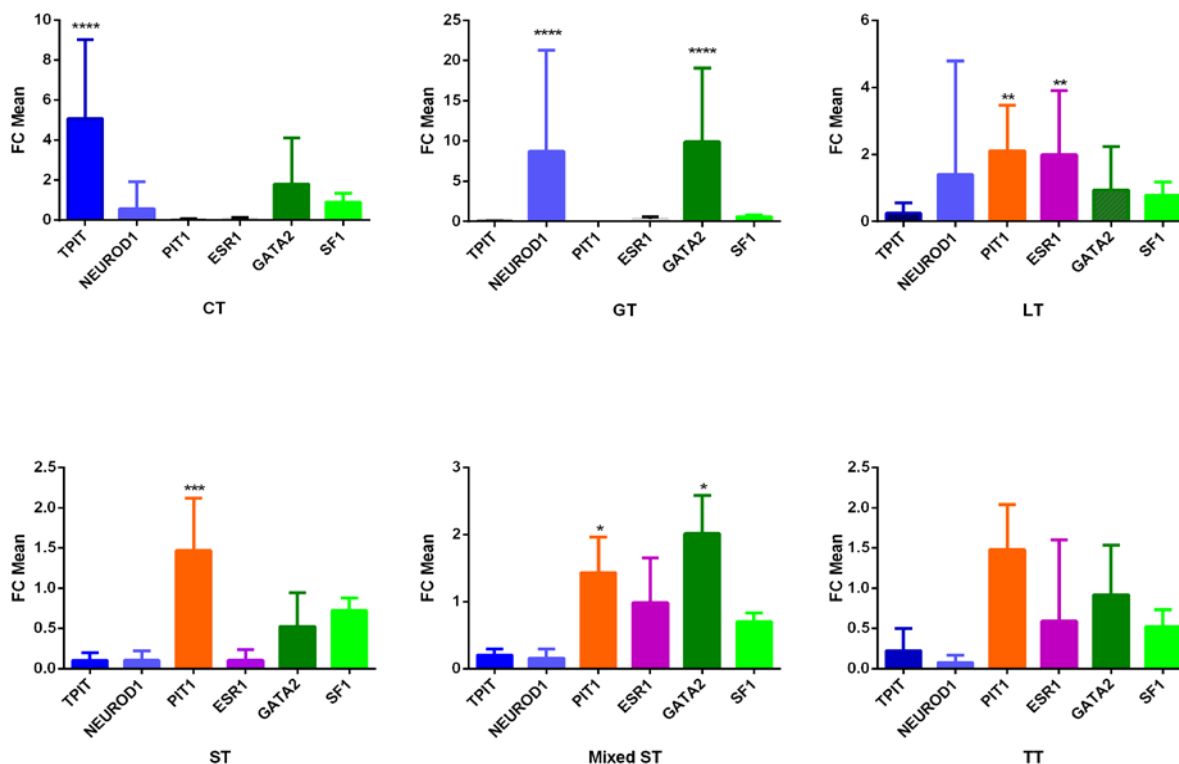


Figura 1. Fold Change de la media de los factores de transcripción. CT, tumores corticotropos; GT, tumores gonadotropos; LT, tumores lactotropos; ST, tumores somatotropos; TT, tumores tirotropos. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

Las características demográficas, clínicas, bioquímicas, inmunohistoquímicas y moleculares de los 251 pacientes incluidos en este trabajo se muestran en la Tabla Suplementaria Artículo 1 (Anexo I).

En algunos pacientes hubo discordancia entre la identificación molecular e IHQ de los subtipos de TH. Esta discordancia fue atribuida al hecho de que los estudios de IHQ se realizaron en diferentes departamentos de patología mientras que el estudio molecular se centralizó en el Laboratorio de Investigación del HGUA.

2. Identificación y frecuencia de los subtipos de TH de acuerdo con la expresión de los genes y proteínas de las hormonas adenohipofisarias

Los genes de las hormonas adenohipofisarias utilizados para identificar los subtipos de TH fueron *GH, FSH, LH, TSH, PRL, POMC, AVPR1B* y *CRHR1* y las hormonas fueron GH, FSH, LH, TSH y ACTH. En la tabla 1 se muestra la frecuencia de los diferentes subtipos de TH sobre la base de la expresión génica (n=251) o proteica (n=56) de las hormonas adenohipofisarias. Los subtipos más prevalentes en el estudio molecular fueron los GT y los ST, seguidos de los CT y los TN. En el estudio inmunohistoquímico, los subtipos más frecuentes también fueron los GT y los ST, seguidos de los TN y de los CT.

Resultados

Tabla 1. Frecuencia de los subtipos de TH identificados según la expresión génica (a) (serie completa) o proteica (b) (subconjunto) de las hormonas adenohipofisarias específicas.

a)		b)	
TH	Molecular n (%) Hormonas	TH	IHQ n (%) Hormonas
ST	46 (18.3)	ST	12 (21.4)
F-ST	44 (95.6)	F-ST	11 (91.7)
S-ST	2 (4.3)	S-ST	1 (8.3)
LT	17 (6.8)	LT	4 (7.1)
F-LT	8 (47.1)	F-LT	4 (100)
S-LT	9 (52.9)	S-LT	0 (0.0)
TT	14 (5.6)	TT	3 (5.4)
F-TT	3 (21.4)	F-TT	1 (33.3)
S-TT	11 (78.6)	S-TT	2 (66.7)
PH Pit-1	5 (2.0)	PH Pit-1	0 (0.0)
F-PH Pit-1	4 (80)		
S-PH Pit-1	1 (20)		
CT	44 (17.5)	CT	7 (12.5)
F-CT	19 (43.2)	F-CT	2 (28.6)
S-CT	25 (56.8)	S-CT	5 (71.4)
GT	71 (28.2)	GT	19 (33.9)
TN	41 (16.3)	TN	9 (16.1)
TPHU	13 (5.2)	TPHU	2 (3.6)
F-TPHU	5 (38.5)	F-TPHU	0 (0.0)
S-TPHU	8 (61.5)	S-TPHU	2 (100)
Total	251 (100)	Total	56 (100)

TH, tumores hipofisarios neuroendocrinos; IHQ, inmunohistoquímica; F, funcionantes; S, silentes; ST, tumor somatotropo; LT, tumor lactotropo; TT, tumor tirotrópico; PH Pit-1, plurihormonal Pit-1; CT, tumor corticotropo; GT, tumor gonadotropo; TN, tumor de células nulas o null cell; TPHU, tumor plurihormonal inusual.

3. Identificación y frecuencia de los distintos subtipos TH sobre la base del estudio molecular (RT-qPCR) e inmunohistoquímico de los factores de transcripción hipofisarios.

La identificación de la expresión génica (RT-qPCR) (N=251) y de la expresión proteica (IHQ) (N= 56) de los factores de transcripción hipofisarios permitió clasificar la colección de tumores en CT, GT, PH- PIT-1, PH inusuales y tumores nulos.

3.1. Expresión génica de los factores de transcripción en los diferentes subtipos de TH.

Los perfiles de expresión génica (RT-qPCR) de los factores de transcripción se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Expresión molecular (RT-qPCR) de los factores de transcripción en la muestra completa.

Molecular Subtipo (n)	PIT-1 ARNm n (%)	TPIT ARNm n (%)	SF-1 ARNm n (%)	GATA2 ARNm n (%)	NEUROD1 ARNm n (%)	ESR1 ARNm n (%)
ST (50)	48 (96)	0 (0)	5 (10)	6 (12)	8 (16)	4 (8)
GT (71)	0 (0)	2 (2.82)	26 (36.62)	62 (87.32)	53 (74.65)	3 (4.22)
CT (44)	3 (6.82)	38 (86.36)	7 (15.90)	9 (20.45)	18 (40.90)	0 (0)
TT (14)	10 (71.43)	1 (7.14)	1 (7.14)	7 (50)	5 (35.71)	1 (7.14)
LT (13)	10 (76.92)	1 (7.69)	1 (7.69)	5 (38.46)	2 (15.38)	7 (53.85)
TPHU (13)	5 (38.46)	3 (23.07)	3 (23.07)	7 (53.85)	8 (61.54)	3 (23.08)
PH-Pit-1 (5)	5 (100)	0 (0)	1 (20)	1 (20)	2 (40)	0 (0)
TN (41)	4 (9.76)	2 (4.88)	7 (17.07)	38 (92.68)	25 (60.97)	2 (4.88)

ST, tumores somatotropos; GT, tumores gonadotropos; CT, tumores corticotropos; TT, tumores tirotropos; LT, tumores lactotropos; TT, tumores tirotropos; TPHU, plurihormonales inusuales; PH Pit-1, plurihormonales Pit-1; TN, tumor de células nulas o null cell.

Además del factor de transcripción específico de la hipófisis que definió los diferentes subtipos de TH, la mayoría de los tumores expresaron todos o parte de los otros factores de transcripción en diferentes cantidades (Tabla 2 y Figura 1).

Resultados

Los ST, TT y LT expresaron predominantemente *POU1F1* (Pit-1). Los CT expresaron *Tpit* y *NEUROD1*. Sólo el 36.6% de los GT expresaron *SF-1* y en cantidades similares a otros subtipos. Por el contrario, el 87.3% de los GT expresaron *GATA2* (factor de transcripción involucrado en el desarrollo de células gonadotropas) confirmando el diagnóstico correcto de la línea celular gonadotropa. Adicionalmente, el 20.4% de los CT expresaron *GATA2* mientras que el 74.6% de los GT expresaron *NEUROD1*, lo que sugiere la existencia de un subtipo cortico-gonadotropo. De forma similar, el 50% de los TT expresaron *GATA2* y el 54% de los LT y el 4.2% de los GT *ESR1*. Finalmente, 5 tumores plurihormonales, con expresión molecular de una combinación de *GH*, *PRL* o *TSH*, expresaron *POU1F1* (Pit-1).

3.2. Expresión proteica y génica de los factores de transcripción en el subconjunto de 56 tumores

Los perfiles de expresión proteica (IHQ) y molecular (RT-qPCR) de los factores de transcripción de los diferentes subtipos de TH en el subconjunto de 56 tumores, y las imágenes representativas de muestras con IHQ positiva se recogen en la Tabla 3 y la Figura 2 respectivamente.

Tabla 3. Expresión proteica (IHQ) y molecular (RT-qPCR) de los factores de transcripción en el subconjunto de muestras.

Subtipo clínico n (%)	Pit-1		Tpit		SF-1		GATA2
	IHQ	ARNm	IHQ	ARNm	IHQ	ARNm	ARNm
ST (12)	12 (100)	12 (100)	0	0	2 (16.66)	1 (8.33)	4 (33.33)
GT (19)	2 (10.53)	0	1 (5.26)	0	18 (94.74)	2 (10.53)	17 (89.47)
CT (7)	0	0	7 (100)	7 (100)	0	1 (14.28)	3 (42.86)
TT (3)	2 (66.66)	2 (66.66)	0	0	0	0	2 (66.66)
LT (4)	4 (100)	3 (75)	0	0	0	1 (25)	1 (25)
TPHU(2)	1 (50)	0	0	0	1 (50)	0	2 (100)
TN (9)	2 (22.22)	0	0	0	9 (100)	1 (11.11)	8 (88.88)

IHQ, inmunohistoquímica; *ST*, tumor somatotropo; *GT*, tumor gonadotropo; *CT*, tumor corticotropo; *TT*, tumor tirotrópico; *LT*, tumor lactotropo; *TPHU*, tumor plurihormonal inusual; *TN*, tumor de células nulas o null cell. *GATA2* no fue medido por IHQ.

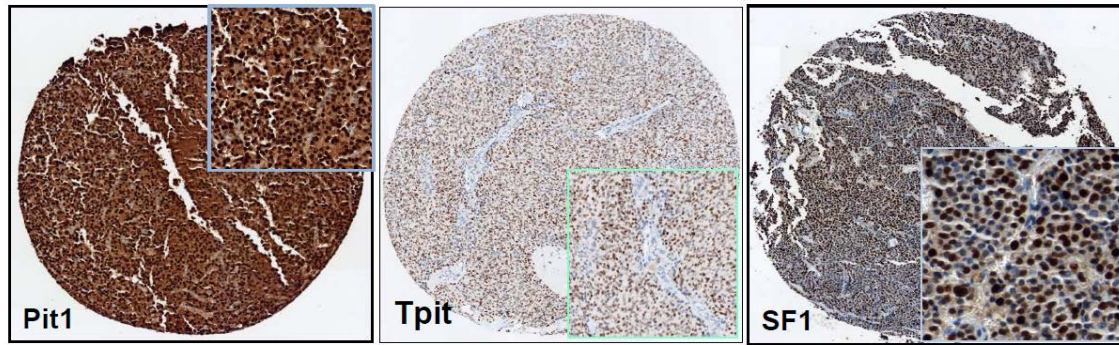


Figura 2. Imágenes representativas de la expresión IHQ de los factores de transcripción.

Los ST, LT y TT expresaron Pit-1 (POU1F1) tanto a nivel genético como proteico. Los CT expresaron TPIT por ambas técnicas. El 94.7% de los GT expresaron SF-1 y sólo el 10.5% expresaron el gen *SF-1*.

3.3. Frecuencia absoluta y relativa de los diferentes subtipos de TH según la expresión génica o proteica de los factores de transcripción

La frecuencia de distribución de los diferentes subtipos de TH identificados según la expresión génica (RT-qPCR) o proteica (IHQ) de los factores de transcripción se muestra en la Tabla 4 y Figura 3.

Los tumores GT fueron los más prevalentes, seguidos de los tumores de la línea celular Pit-1 y de los CT, mientras que el porcentaje de tumores nulos se redujo drásticamente en comparación con la clasificación anterior.

Resultados

Tabla 4. Frecuencia de los subtipos de TH identificados según la expresión molecular (RT-qPCR) e IHQ de los factores de transcripción.

TH	Molecular n (%)	IHQ n (%)
Pit-1	79 (31.3)	17 (30.4)
Pit-1-F	64 (81.0)	14 (82.3)
Pit-1-S	15 (19.0)	3 (17.7)
CT	39 (15.5)	7 (12.5)
F-CT	18 (46.1)	2 (28.6)
S-CT	21 (53.9)	5 (71.4)
GT	111 (44.0)	23 (41.1)
TN	8 (3.2)	2 (3.6)
TPHU	14 (5.6)	7 (12.5)
F-TPHU	3 (21.4)	2 (28.6)
S-TPHU	11 (78.6)	5 (71.4)
Total	251 (100)	56 (100)

TH, tumor hipofisario neuroendocrino; IHQ, inmunohistoquímica; FT, factor de transcripción; F, funcionantes; S, silentes; CT, tumor corticotropo; GT, tumor gonadotropo; TN, tumor de células nulas o null cell; TPHU, tumor plurihormonal inusual.

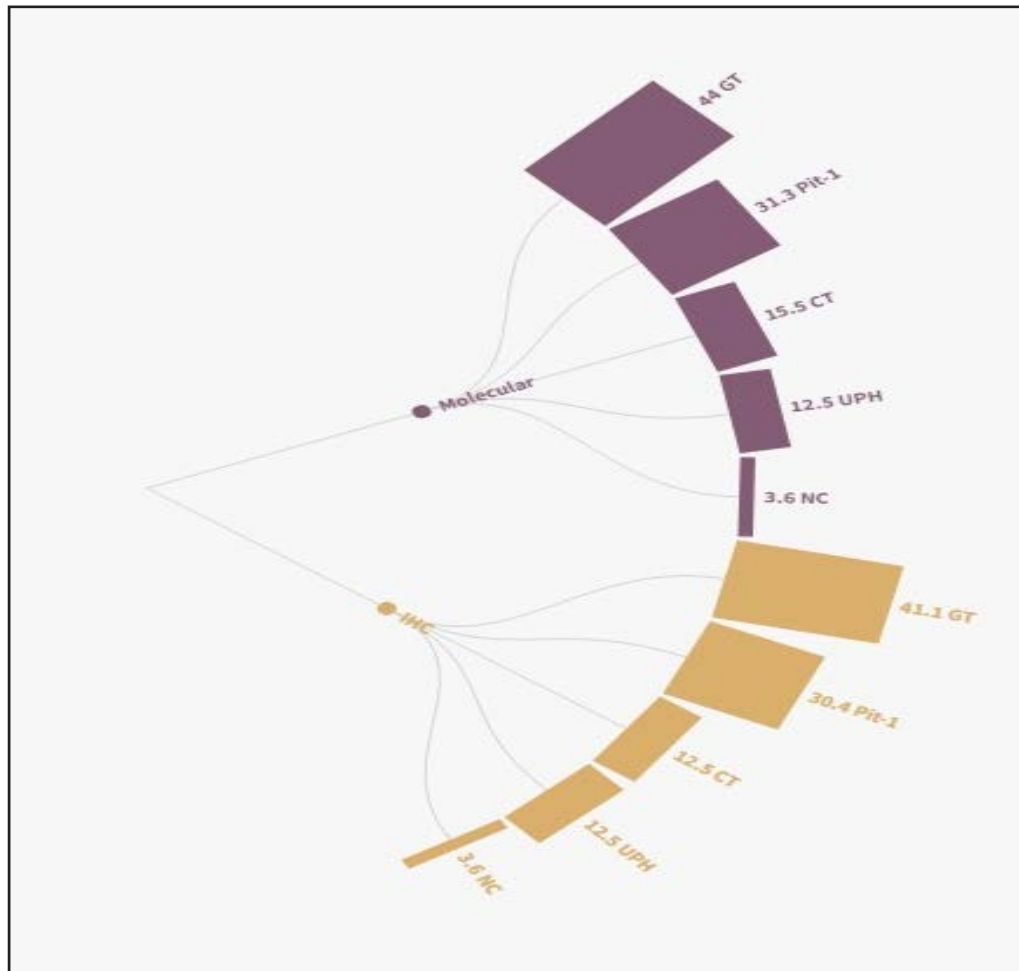


Figura 3: Frecuencia de los TH en función de la determinación molecular de los factores de transcripción.

IHC, inmunohistoquímica; GT, tumor gonadotropo; Pit-1, tumor de estirpe Pit-1; CT, tumor corticotropo; UPH, tumor plurihormonal inusual; NC, tumor de células nulas o null cell.

4. Concordancia entre identificación molecular e IHQ de los subtipos TH según los factores de transcripción en el subconjunto de la muestra.

En la tabla 5 se muestra la concordancia entre la identificación de los subtipos de TH basada en la expresión génica (por qRT-PCR) y la proteica (por IHQ) de los factores de transcripción hipofisarios en el subconjunto de 56 pacientes.

Resultados

Tabla 5. Concordancia entre la identificación molecular e IHQ de los factores de transcripción.

Subtipo	IHQ N	Molecular N	Kappa	p-value
CT (TPIT)	7	6	0.913	<0.001
GT (SF-1;GATA2)	23	30	0.612	<0.001
Pit-1 (Pit-1; POUF-1)	17	15	0.825	<0.001
TPHU	7	3	0.135	0.262
TN	2	2	-0.037	0.782

IHQ, inmunohistoquímica; TF, factor de transcripción; k-coeff, coeficiente kappa; CT, tumor corticotropo; GT, tumor gonadotropo; TPHU, tumor plurihormonal inusual; TN, tumor de células nulas.

Se observa un alto nivel de concordancia entre la inmunopositividad y la expresión génica de *Tpit* y *TPIT* y de *Pit-1* y *POUF-1*. Aunque no se ha encontrado concordancia entre el nivel de expresión de *SF-1* por IHQ y por expresión génica si ha existido entre la expresión génica de *GATA2* y la expresión IHQ de *SF-1*.

5. Casos discordantes

Una vez identificados molecularmente todos los casos basados en los factores de transcripción, se observó alguna discordancia con respecto a la identificación según la expresión de los genes de las hormonas adenohipofisarias. Concretamente, 7 CT fueron reclasificados como GT, PHU y Pit-1; 5 GT fueron reclasificados como TN y TPHU; 4 ST como TN y TPHU; 3 LT como GT y CT; 5 TT como TPHU, GT, TN y CT; 6 TPHU como GT, TN y Pit-1 y 40 TN fueron reclasificados como GT, TPHU y Pit-1.

ARTÍCULO 2

María Eugenia Torregrosa-Quesada, Araceli García-Martínez, Ángel Sánchez-Barbie, Sandra Silva-Ortega, Rosa Cámara, Carmen Fajardo, Cristina Lamas, Ignacio Aranda, Antonio Picó. The silent variants of pituitary tumors: demographic, radiological and molecular characteristics. *J Endocrinol Invest* (2021). <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01468-2>. Factor de impacto: 3.398. Q2.

1. Características demográficas, clínicas y radiológicas en la serie global (n=268)

De los 268 tumores clasificados según la expresión proteica (IHQ) de las hormonas adenohipofisarias, 107 eran funcionantes (39.9%) y 161 silentes (60.1%). El 51.9% de los pacientes fueron mujeres, el 95.5% presentaron edades por encima de los 25 años (media de edad y desviación estándar 49.74 ± 15.37), el 89.6% de los tumores fueron macroadenomas y el 56.3% invasivos (Figura 1).

Resultados

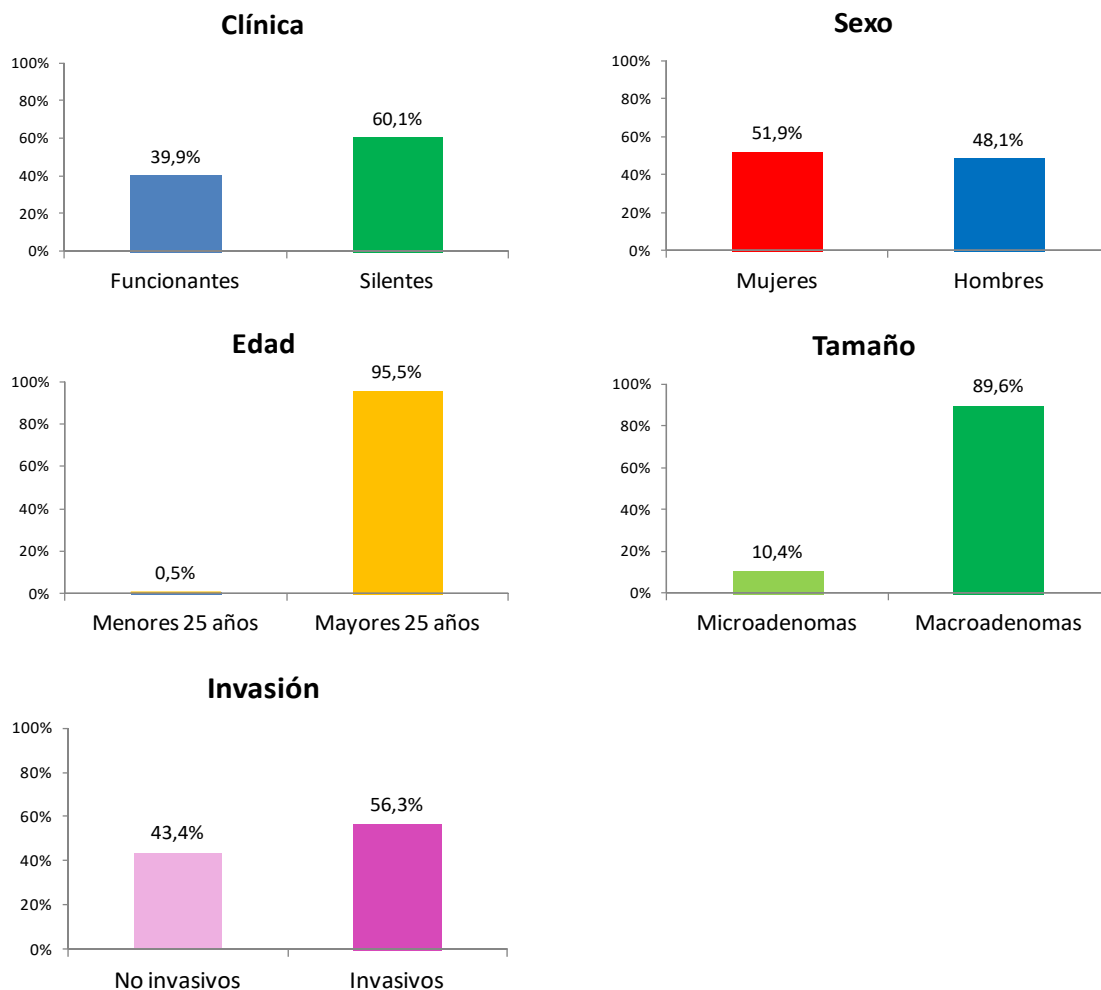


Figura 1. Características demográficas, clínicas y radiológicas en la serie global.

2. Frecuencia de los subtipos de TH en la serie global identificados por los estudios inmunohistoquímicos y moleculares de las hormonas adenohipofisarias

La frecuencia de los diferentes subtipos de TH basada en la evaluación IHQ de las proteínas y en la expresión de los genes (RT-qPCR) de las hormonas adenohipofisarias en los 268 tumores se muestra en la Tabla 1. Se observaron cambios en la frecuencia dependiendo del método de identificación. El estudio IHQ mostró una mayor frecuencia de los subtipos ST y TN seguidos de los GT y los CT. En el estudio molecular de la expresión de los genes de las hormonas los subtipos más frecuentes fueron los GT.

Las diferencias más destacadas se encontraron en los TN y los GT cuya frecuencia cambió de 22.4% y 14.9% respectivamente, en la identificación IHQ a 6.7% y 33.2% respectivamente, en la identificación molecular. Agrupando los tumores procedentes de la línea celular Pit-1 (ST, LT y TT), la frecuencia de los tumores Pit-1 fue del 48% cuando fueron estudiados por IHQ y del 30% cuando lo fueron por técnicas moleculares.

Tabla 1. Frecuencia de los distintos subtipos de TH en el total de la serie de acuerdo con la expresión IHQ o génica de las hormonas adenohipofisarias.

TH Subtipos	IHQ		Molecular	
	n	%	n	%
F-ST	37	13.87	36	13,4
S-ST	8	3.0	1	0,4
F-ST Mixto	30	11.2	15	5,6
S-ST Mixto	10	3.7	2	0,7
F-CT	11	4.1	24	9
S-CT	14	5.2	20	7,5
F-LT	11	4.1	8	3
S-LT	9	3.4	7	2,6
F-TT	1	0.4	4	1,5
S-TT	3	1.1	8	3
GT	40	14.9	89	33,2
F-PH	17	6.3	19	7.1
S-PH	17	6.3	17	6.3
TN	60	22.4	18	6,7
TOTAL	268	100	268	100

TH, tumores neuroendocrinos hipofisarios; IHQ, inmunohistoquímica; F-ST, tumor somatotropo funcionante; S-ST, tumor somatotropo silente; F-ST Mixto, tumor somatotropo-lactotropo mixto funcionante; S-ST Mixto, tumor somatotropo-lactotropo mixto silente; F-CT, tumor corticotropo funcionante; S-CT, tumor corticotropo silente; F-LT, tumor lactotropo funcionante; S-LT, tumor lactotropo silente; F-TT, tumor tirotrópico funcionante; S-TT, tumor tirotrópico silente; GT, tumor gonadotropo; F-PH, tumor plurihormonal funcionante; S-PH, tumor plurihormonal silente; TN, tumor de células nulas o null cell.

3. Diferencias demográficas, clínicas y radiológicas entre los subtipos de TH funcionantes y silentes de acuerdo a su identificación IHQ

Los tumores silentes fueron de mayor tamaño (97,5% frente a 77,6% de macroadenomas $p < 0.001$) (26.65 ± 9.76 mm vs 17.2 ± 10.20 mm $p < 0.001$) y más invasivos (67.1 vs 40.2%; $p < 0.001$) que los funcionantes. Además, fueron más prevalentes en los hombres (61.7%) y se diagnosticaron más tarde (54.71 ± 14.84 vs 42.25 ± 12.98 años; $p < 0.001$).

Las diferencias por subtipos se muestran en la Tabla 2. En el análisis de las diferencias en estas variables entre funcionantes y silentes en los distintos subtipos de TH inmunohistoquímicamente identificados encontramos una mayor frecuencia de macroadenomas en los CT silentes (73,7% vs 26.3%, $p < 0.001$) y una mayor edad media en los LT silentes (64.44 ± 13.42 vs 35 ± 20.61 , $p = 0.007$). En los PH encontramos, que en los silentes la edad media fue mayor que en los funcionantes ($56,88 \pm 15,63$ vs $39,12 \pm 11,33$) ($p = 0.001$) así como la frecuencia de macroadenomas (66,6% vs 33,3 %) ($p = 0,001$) y la de invasión (71,4 vs 28,5%) ($p = 0,034$).

Tabla 2. Diferencias clínicas y radiológicas entre los subtipos de TH funcionantes y silentes de acuerdo a su identificación IHQ.

	TOTAL	FUNCIONANTES (n=107)	SILENTES (n=161)	p-valor	
ST	n (%)	45 (16,79)	37 (82,22)	8 (17,78)	
	Edad	44,67 ± 12,76	44,14 ± 12,96	47,3 ± 12,28	0,634
	Mujer n (%)	28 (62,22)	25 (89,3)	3 (10,7)	0,117
	Macro n (%)	43 (95,55)	35 (94,6)	8 (100)	0,370
	Diámetro mayor (mm) media±SD	19,6 ± 9,65	18,81 ± 9,41	23,25 ± 10,54 ^a	0,184
	Invasivo n (%)	21 (46,67) ^b	16 (43,2)	5 (62,5)	0,321
	Proliferativo n (%)	5 (11,1%)	5 (13,5 %)	0 (0 %)	
	GH (ng/mL) (n) media±SD		(33) 20,78 ± 24,16	(5) 2,36 ± 2,73	
	IGF-1 (ng/mL) (n) media±SD		(36) 864,29 ± 361,69	(6) 204,17 ± 135,19	
ST Mixto	n (%)	40 (14,92)	30 (75)	10(25)	
	Edad	45,80 ± 11,02	45,17 ± 10,39	47,7 ± 13,14	0,767
	Mujer n (%)	20 (50)	16 (80)	4 (20)	0,464
	Macro n (%)	33 (82,5)	24 (80,0)	9 (90,0)	0,449
	Diámetro mayor (mm) media±SD	17,79 ± 9,17	16,0 ± 8,41	22,8 ± 9,81 ^a	0,045
	Invasivo n (%)	18 (45) ^b	12 (40,0)	6 (60,0)	0,271
	Proliferativo n (%)	4 (10)	3(10)	1(10)	
	GH (ng/mL) (n) media±SD		(24) 22,56 ± 36,58	(8) 0,244 ± 0,13	
	IGF-1 (ng/mL) (n) media±SD		(25) 879,52 ± 431,67	(8) 136,95 ± 60,036	
	PRL (ng/mL)(n) media±SD		(23) 161,29 ± 463,52	(9) 35,88 ± 31,57	
CT	n (%)	25 (9,32)	11 (44)	14 (56)	
	Edad	41,52 ± 13,25	40,27 ± 10,98	42,5 ± 15,13	0,762
	Mujer n (%)	13 (52)	7 (53,8)	6 (46,2)	0,300
	Macro n (%)	19 (76)	5 (45,4)	14 (100)	<0,001
	Diámetro mayor (mm) media±SD	20,67 ± 13,25	13,55 ± 9,83	26,69 ± 13,57 ^c	0,016
	Invasivo n (%)	10 (40)	4 (36,4)	6 (42,9)	0,494
	Proliferativos n (%)	3 (12)	1 (9 %)	2 (14,2)	
	Cortisol sérico (µg/dL) (n) media±SD		(11) 23,62 ± 11,99	(10) 18,95 ± 12,32	
	ACTH (pg/mL) (n) media±SD		(11) 98,49 ± 60,83	(7) 103,23 ± 83,76	
LT	n (%)	20 (7,46)	11 (55)	9 (45)	
	Edad	48,25 ± 22,92	35 ± 20,61	64,44 ± 13,42	0,007
	Mujer n (%)	8 (40)	3 (37,5)	5 (62,5)	0,197
	Macro n (%)	19 (95)	10 (90,9)	9 (100)	0,266
	Diámetro mayor (mm) media±SD	27,95 ± 12,03	26,45 ± 14,90	29,78 ± 7,71	0,223
	Invasivo n (%)	13 (65)	7 (63,6)	6 (66,7)	0,888
	Proliferativos n (%)	3 (15)	2(18,2)	1 (11,1)	
	PRL (ng/mL)(n) media±SD		(10) 2379,34 ± 4965,71	(9) 49,90 ± 42,66	

Resultados

	n (%)	4 (1,49)	1 (25)	3 (75)	
	Edad	51,25 ± 16,03	40	55 ± 17,35	0,346
	Mujer n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	na
	Macro n (%)	4 (100)	1 (100)	3 (100)	na
TT	Diámetro mayor (mm) media±SD	26,75 ± 17,84	10 ± 0	32,33 ± 17,04	0,180
	Invasivo n (%)	1 (25)	0 (0)	1 (33,3)	0,410
	Proliferativos n (%)	1 (25)	0 (0)	1 (33,3)	
	TSH (mU/L) (n) media±SD		(1) 2,40	(2) 2,17 ± 2,651	
	FT4 (ng/dL) (n) media±SD		(1) 2,84	(2) 0,75 ± 0,353	
	n (%)	34 (12,68)	17(50)	17(50)	
	Edad	48,00 ± 16,18	39,12 ± 11,33	56,88 ± 15,63	0,001
	Mujer n (%)	26 (76,47)	15 (57,69)	11 (42,31)	0,100
PH	Macro n (%)	24 (70,58)	8 (47,1)	16 (94,1)	0,001
	Diámetro mayor (mm) media±SD	18,75 ± 11,21	12,19 ± 7,06	25,31 ± 10,88	0,001
	Invasivo n (%)	14 (41,17)	4 (28,57)	10 (71,43)	0,034
	Proliferativos n (%)	4 (11,7)	3 (17,6)	1 (5,8)	
	n (%)	40 (14,92)	0 (0)	40 (100)	
	Edad	54,75 ± 14,51		54,75 ± 14,51	na
	Mujer n (%)	17 (42,5)		17 (42,5)	na
GT	Macro n (%)	40 (100)		40 (100)	na
	Diámetro mayor (mm) media±SD	26,92 ± 8,02		26,92 ± 8,02	na
	Invasivo n (%)	29 (72,5)		29 (72,5)	na
	Proliferativos n (%)	3 (7,5)		3 (7,5)	
	n (%)	60 (22,39)	0 (0)	60 (100)	
	Edad	57,63 ± 13,66		57,63 ± 13,66	na
	Mujer n (%)	27 (45)		27 (45)	na
TN	Macro n (%)	58 (96,7)		58 (96,7)	na
	Diámetro mayor (mm) media±SD	27,19 ± 9,49		27,19 ± 9,49	na
	Invasivo n (%)	44 (73,3)		44 (73,3)	na
	Proliferativos n (%)	5 (8,3)	0	5 (8,3)	
TOTAL	Diámetro mayor (mm) media±SD	22,86 ± 10,95	17,20 ± 10,20	26,65 ± 9,76	0,001
	Invasivos n (%)	149 (55,6)	43 (40,2)	106 (65,8)	<.0.001
	Proliferativos (%)	28 (10,4)	14 (13,1)	14 (8,7)	0,25

ST, tumor somatotropo; ST Mixto, tumor mixto somatotropo-lactotropo; CT, tumor corticotropo; LT, tumor lactotropo; TT, tumor tirotrópico; PH, tumor plurihormonal; GT, tumor gonadotropo; TN, tumor de células nulas o null cell; na, no aplicable.

a: $p=0,894$ (diámetro ST mixtos silentes vs ST puros silentes)

b: $p=0,878^*$ (% invasivos en ST totales puros vs % invasivos en ST totales mixtos)

c: $p=0,335$ (diámetro CT silentes vs diámetro GT)

* El 53,3% de los ST puros son no invasivos (46,7% invasivos). El 55% de los ST mixtos son no invasivos (45% invasivos).

4. Diferencias en la expresión de los genes de las hormonas adenohipofisarias entre los subtipos de TH funcionantes y silentes de acuerdo a su identificación IHQ

Las diferencias en la expresión molecular de los genes específicos de las hormonas adenohipofisarias entre los subtipos de TH funcionantes y los silentes, identificados según la expresión proteica (IHQ) de las hormonas adenohipofisarias, se muestran en la Tabla 3 y Figura 2.

Los ST, ST mixtos y LT funcionantes expresaron más *GH* y *PRL* respectivamente que las correspondientes variantes silentes. Por el contrario, no hubo diferencias significativas en la expresión de *POMC*, *CHRH* y *AVPR1B* entre los CT funcionantes y los silentes. La variantes funcionantes de los PH, en su conjunto, sin diferenciar entre PH-Pit 1 y PH-Inusual, mostraron una mayor expresión de *PRL*, *POMC* y *AVPR1* y una menor expresión de *FSH* que las variantes silentes.

Tabla 3. Diferencias en la expresión génica de los diferentes subtipos de TH (identificados IHQ) en función de que asocien (funcionantes) o no (silentes) un síndrome endocrinológico específico.

SUBTIPOS	GENES	FUNCIONANTES	SILENTES	p-valor
		n FC (media ± SD)	n FC (media ± SD)	
ST		37	8	
	GH	1,32 ± 1,25	0,05 ± 0,09	<0,001
ST Mixto		30	10	
	GH	1,46 ± 1,56	0,66 ± 0,19	<0,001
	PRL	5,85 ± 23,98	1,73 ± 3,45	0,36
CT		11	14	
	POMC	3,98 ± 4,02	6,06 ± 6,48	0,335
	AVPR1B	26,71 ± 24,85	42,39 ± 56,66	0,365
	CRHR1	25,56 ± 25,21	14,01 ± 17,0932	0,21
LT		11	9	
	PRL	6,96 ± 8,16	0,34 ± 0,92	0,023
TT		1	3	
	TSH	NP	NP	NP
PH		17	17	
	GH	4,58 ± 12,05	0,06 ± 0,18	0,140
	PRL	0,68 ± 1,56	0,28 ± 0,72	0,041
	TSH	2,00 ± 4,74	0,85 ± 1,53	0,290
	POMC	5,53 ± 8,12	0,68 ± 1,50	0,002
	AVPR1B	12,19 ± 19,25	10,33 ± 26,47	0,045
	CRHR1	13,03 ± 18,11	9,59 ± 22,57	0,067
	FSH	0,37 ± 1,33	3,87 ± 12,54	0,001
LH	0,23 ± 0,47	0,08 ± 0,18	1,000	

ST, tumor somatotropo; ST Mixto, tumor somatotropo-lactotropo mixto; CT, tumor corticotropo; LT, tumor lactotropo; TT, tumor tirotrópico; PH tumor plurihormonal.

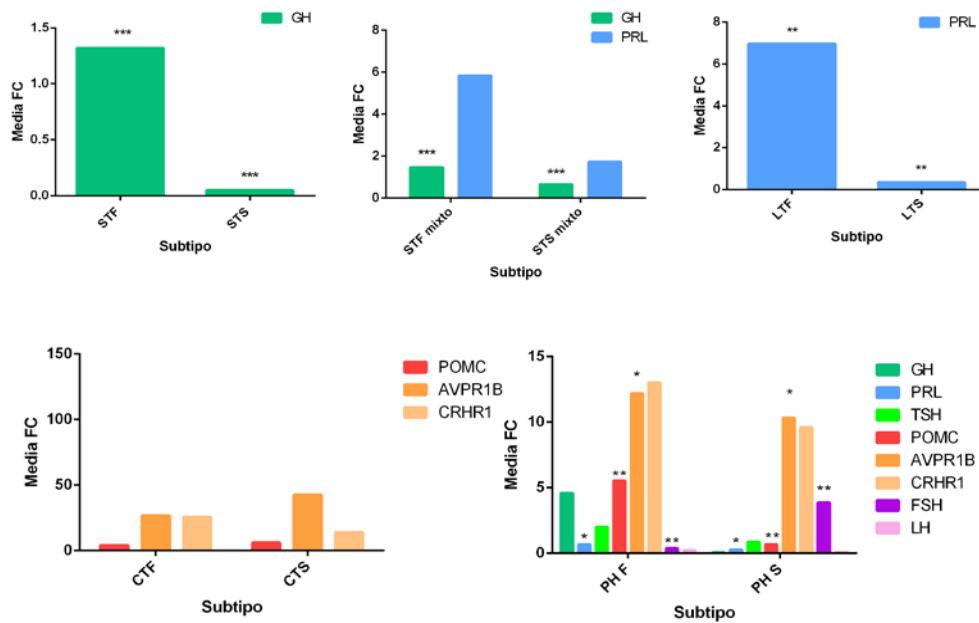


Figura 2: Diferencias en la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias entre funcionantes y silentes.

STF, tumor somatotrofo funcionante; STS, tumor somatotrofo silente; STF Mixto, tumor somatotrofo-lactotrofo mixto funcionante; STS Mixto, tumor somatotrofo-lactotrofo mixto silente; LTF, tumor lactotrofo funcionante; LTS, tumor lactotrofo silente; CTF, tumor corticotrofo funcionante; CTS, tumor corticotrofo silente; PHF, tumor plurihormonal funcionante; PHS, tumor plurihormonal silente. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

Discusión

Las discusiones de cada una de las publicaciones se muestran en su formato original en los anexos. A continuación, se destacan los aspectos más relevantes de esta línea de investigación.

La presente investigación incluye el primer estudio que caracteriza una gran serie de TH (n =251) de acuerdo con la expresión génica de los factores de transcripción específicos de la hipófisis, siguiendo las recomendaciones de la clasificación de tumores hipofisarios de la OMS de 2017 (**Artículo 1**). Además, se demuestra una buena concordancia entre la identificación molecular e IHQ de los subtipos de TH basada en la expresión de los factores de transcripción en un subconjunto de 56 tumores.

La hipófisis contiene diferentes líneas celulares responsables de la producción de hormonas específicas, característica utilizada para su identificación IHQ mediante la utilización de anticuerpos específicos frente a estas hormonas⁵². De hecho, la clasificación de la OMS de 2004 de los tumores hipofisarios se basó en la expresión proteica (IHQ) de las hormonas adenohipofisarias. Sin embargo, aunque la principal ventaja de esta clasificación fue considerar la citodiferenciación de los tumores hipofisarios, quedó sin tipificar un porcentaje importante de tumores nulos y plurihormonales.

Posteriormente, en el año 2015, Nishioka y colaboradores evaluaron la utilidad de los factores de transcripción de las líneas celulares hipofisarias en la caracterización de los TH¹⁹. Al estudiar 119 tumores TN utilizando los factores Pit-1, Tpit, SF-1 y el receptor de estrógeno- α (ER α), pudieron reclasificar el 95% de estos tumores como tumores GT, CT o derivados de Pit-1(LT, ST o TT). Sobre la base de estos y otros resultados, la cuarta edición de la clasificación de la OMS de tumores endocrinos del 2017 reconoce la importancia de los factores de transcripción en la diferenciación tumoral de acuerdo a su línea celular de procedencia⁴⁰. Esta nueva clasificación continúa basándose en la IHQ de las hormonas hipofisarias, pero incorpora el estudio de la expresión proteica de los factores de transcripción. Sin embargo, la falta de disponibilidad de personal capacitado y las dificultades para encontrar algunos anticuerpos frente a los factores de transcripción de las líneas celulares, han dificultado, por el momento, su implementación en la clínica diaria en la mayoría de los hospitales.

Discusión

Similar a lo descrito por Nishioka et al¹⁹, el estudio molecular de la serie global del presente estudio permitió la reclasificación del 80.5% de los TN, reduciendo su frecuencia del 16.3% al 3.2%. Estos resultados fueron corroborados por el estudio inmunohistoquímico de los factores de transcripción en el subgrupo de 56 tumores. Los tumores nulos se definieron inicialmente como tumores cromófobos sin signos inmunohistoquímicos de diferenciación celular específica de hipófisis y con características específicas en el estudio de microscopía electrónica⁵³. La clasificación de la OMS de 2017 añadió para su identificación la ausencia de positividad para cualquiera de los 3 factores de transcripción adenohipofisarios. Históricamente se ha considerado que los tumores nulos suponían hasta el 30% de los tumores no funcionantes. La incorporación del estudio IHQ de los factores de transcripción ha supuesto pues, una drástica reducción de estos porcentajes, permitiendo una tipificación mucho más precisa de los subtipos de tumores hipofisarios.

La mayoría de los tumores nulos se reclasifican como tumores gonadotropos^{3,19,54}. En nuestra serie esto ocurrió en el 94% de los casos. Los tumores gonadotropos y los tumores nulos comparten características histológicas. Ambos son tumores cromófobos PAS negativos y contienen aparato de Golgi, retículo endoplásmico y gránulos secretores pequeños por microscopía electrónica. Estudios moleculares mediante RT-qPCR han demostrado la expresión de *FSH* y *LH* en estos tumores^{38,39} y varios estudios han demostrado que los TN liberan β -LH o β -FSH en cultivos de tejido celular⁵⁵, o expresan ARNm de las subunidades α o β de FSH o LH mediante hibridación in situ^{56,57}. La expresión de *SF-1*, *GATA 2* o *ESR1* en la mayoría de los TN de nuestra serie es consistente con estos resultados.

El factor de transcripción específico de la línea gonadotropa es SF-1. El SF-1 es un factor de transcripción perteneciente a la superfamilia de receptores de esteroides. Se expresa en células hipofisarias humanas donde regula la producción de gonadotropinas, específicamente de la subunidad β ⁵⁸. Por tanto, se expresa también en los tirotropinomas productores de la subunidad α pero no de la β ⁵⁹. De hecho, en nuestra serie, sólo un tumor tirotropo (7.14%) expresó *SF-1*, y ninguno produjo la proteína SF-1 en el subestudio IHQ. Por el contrario, los tumores gonadotropos expresaron *SF-1* en el 36.6 % de los tumores

estudiados molecularmente y en el 94.74% del subestudio IHQ. El diseño del estudio no permite explicar la discordancia entre expresión génica y proteica de SF-1 y no existen datos en la literatura sobre los que basarnos. (**Tabla 2, Figura 1, Artículo 1**).

Por el contrario, el 87.32% de los GT expresaron *GATA2* en el estudio molecular. Lamentablemente no medimos la expresión proteica de *GATA 2* en el subestudio IHQ, aunque de forma similar a nuestros resultados, otros estudios han detectado *GATA2* en el 100% de los tumores gonadotropos, tanto por IHQ como por RT-qPCR⁶⁰. *GATA2* es un factor de transcripción *zinc finger* involucrado en el desarrollo de células gonadotropas que, por tanto, podría ser considerado un buen marcador de tumores de la línea celular gonadotropa, aunque no se haya incluido en las recomendaciones de la clasificación de los tumores hipofisarios de la OMS 2017.

Sin embargo, el 20.4% de los CT de nuestra serie también expresó *GATA2*. Dado que, por otro lado, el 74.6% de los GT expresaron *NEUROD1*, estos datos soportan la existencia de un subgrupo mixto de tumor corticotropo-gonadotro ya sugerido por Cooper et al⁴⁵. Este subtipo comparte características celulares de ambos subtipos, GT y CT, expresando *NEUROD1* y SF-1 pero poco o nada de Tpit. Clínicamente, todos los tumores son macroadenomas y se comportan de manera similar a los S-CT.

GATA2 también se expresó en el 50% de los TT. Esto es explicable porque *GATA2* participa en la activación del promotor de la subunidad de tirotrópina^{61,62}, detectándose tanto en tumores GT como en la mayoría de los TT⁶⁰. Por tanto, es posible que la interacción entre *GATA2* y Pit-1 pueda favorecer la diferenciación de los TT.

Los tumores corticotropos derivan de la línea corticotropa. Se han descrito dos reguladores específicos: el factor básico de transcripción helix-loop *NEUROD1* (*NEUROD1*) y el factor de transcripción hipofisario restringido, Tpit (*TPIT*). Ambos ejercen sus efectos transcripcionales mediante la activación de la transcripción de *POMC* a través de su interacción con Pitx 1^{63,64}. Tpit se coexpresa con *POMC* en los tumores de la línea celular corticotropa tanto funcionantes como silentes, no encontrándose en otros subtipos de TH. Por

tanto, *Tpit* podría ser considerado marcador de CT⁶⁵. De hecho, en la presente investigación, *TPIT* se expresó en el 86.4% de los CT, frente a porcentajes mucho más bajos en el resto de los subtipos tumorales. Por el contrario, *NEUROD1* se expresó de forma no discriminativa en todos los subtipos de TH mostrando una menor utilidad como marcador de tumores de la línea corticotropa.

Como era esperable, los ST, LT y TT expresaron preferentemente el factor de transcripción Pit-1, tanto a nivel génico como proteico. Pit-1 (*PIT-1*) forma parte de la familia de proteínas homeobox involucradas en el desarrollo celular. Participa activamente en la proliferación celular y actividad hormonal de la hipófisis, estimulando a los genes *GH* y *PRL*^{66,67}, y se ha descrito en tumores hipofisarios secretores de TSH, PRL y GH. A diferencia de los transcritos de ARNm de Pit-1, que se encuentran en todas las células hipofisarias, la proteína Pit-1 sólo se ha descrito en las células tiotropas, somatotropas y lactotropas⁶⁸. Su expresión en tumores derivados de otras líneas celulares, como CT, se ha atribuido a la presencia de ARNm de PRL, GH o TSH- β en estos tumores⁶⁹. De hecho, un 7% de los CT de la serie expresaron *Pit-1*, mientras que ningún CT del subgrupo con estudios IHQ expresó la proteína. Esto podría explicar la concordancia de tan sólo 0.825 (coeficiente Kappa) entre la determinación molecular e IHQ de Pit-1 en el presente estudio (**Tabla 5, Artículo 1**).

Adicionalmente, cinco tumores PH expresaron una combinación de los genes *GH*, *PRL* o *TSH*, sugiriendo provenir de la línea celular Pit-1. En todos, el estudio de la expresión génica del factor de transcripción *PIT-1* confirmó el diagnóstico. Recientemente, se ha publicado que los tumores plurihormonales Pit-1 incluyen tumores inmunopositivos para TSH, GH y PRL y, en algunos casos también para ACTH⁷⁰. Se ha propuesto que el subtipo tumoral hipofisario plurihormonal Pit-1 constituye una entidad diferente dentro de los tumores plurihormonales hipofisarios, equiparándose al anterior subtipo 3 de adenomas hipofisarios. El subtipo 3 es un tumor hipofisario de características especialmente agresivas e incluye habitualmente tumores silentes. Su diagnóstico es fundamentalmente estructural (microscopía electrónica) y se ha estimado una prevalencia inferior al 1%⁷¹, coincidiendo con nuestros resultados (2%). Sin

embargo, nosotros no hemos encontrado que este subtipo tumoral se exprese de forma más agresiva que otros subtipos tumorales silente.

A diferencia de los tumores plurihormonales Pit-1, los plurihormonales inusuales supusieron el 5.6% y el 12.5% en el análisis molecular e inmunohistoquímico respectivamente de los factores de transcripción de nuestra serie. El 78.6% de ellos fueron silentes. Estos tumores, de etiología poco conocida, expresan combinaciones de líneas celulares inexplicables por citodiferenciación. Algunos autores han propuesto que podrían provenir de la expansión clonal de células independientes⁷². Actualmente son pocos los casos documentados y la mayoría de las publicaciones hacen referencia a casos aislados o dobles de TH, basándose su tipificación en el estudio IHQ de las hormonas adenohipofisarias⁷³⁻⁷⁷. Solo Kageyama et al⁷⁸ han descrito la coexpresión IHQ de NEUROD1, Tpit y Pit-1 en un tumor silente con positividad para ACTH y PRL. Sin embargo, los resultados encontrados en la presente línea de investigación sugieren que este subtipo de tumor es más frecuente de lo que inicialmente se pensaba o será necesario reclasificarlos.

El 54% de los LT y el 4.22% de los GT expresaron el gen del receptor de estrógeno 1 (*ESR1*). Aunque el 23.08% de los TPHU y el 4,88% de los TN también expresaron *ESR1* muchos de estos tumores fueron positivos para LH/FSH, por lo que fueron reclasificados como GT. Similar a nuestros resultados, estudios previos han encontrado expresión de *ER* alfa y beta en un 60-100 % de los LT y en un 29-61% de los GT^{79,80}. *ESR1* media los efectos mitógenicos de los estrógenos a nivel celular. Existen dos formas de receptor de estrógeno (ER) con diferentes patrones de expresión tisular, ER α y el ER β . El ER α se limita a los LT y GT, donde podría modular la expresión génica mediada por estrógenos⁸¹. Por lo tanto, la expresión de *ESR1* podría ser útil para identificar los LT, pero también los tumores de línea gonadotropa.

Como conclusión el estudio molecular de la expresión génica de los factores de transcripción hipofisarios específicos permite una mejor tipificación de los TH, reduciendo significativamente el porcentaje de tumores nulos, reclasificados en su mayoría como gonadotropos. Adicionalmente complementa al estudio de IHQ en la tipificación adecuada de los tumores PH Pit-1 y TPHU.

El **artículo 2** complementa el artículo 1. Recoge de forma ordenada toda la información demográfica, clínica, radiológica, IHQ y molecular de la serie de tumores hipofisarios del biobanco del hospital de Alicante, en los que se realizó el estudio de los factores de transcripción del artículo 1.

El artículo recoge la tipificación de los subtipos de tumores hipofisarios según resultados de la expresión inmunohistoquímica y molecular de las hormonas adenohipofisarias, no de los factores de transcripción. Cronológicamente, el estudio molecular de la expresión génica de las hormonas adenohipofisarias se realizó antes que el estudio de la expresión de los factores de transcripción y los resultados fueron publicados en el año 2017 y 2019^{38,39} como dos series distintas. En el presente artículo se han unido las 2 series y se ha estudiado la expresión molecular de las hormonas adenohipofisarias en los diferentes subtipos de TH identificados inmunohistoquímicamente. Al tratarse de una serie amplia se ha podido estudiar la prevalencia de los subtipos de tumores hipofisarios y también identificar las variantes silentes de los mismos, permitiendo la comparación con sus contrapartes funcionantes.

Un porcentaje importante de los TH no presenta un síndrome endocrino reconocible y se diagnostican por síntomas neurooftalmológicos o incidentalmente durante la realización de estudios radiológicos de imagen cerebral. Históricamente estos tumores se han denominado NFPA, acrónimo inglés de “Non Functioning Pituitary Adenomas”. Su prevalencia oscila en función de las series, pero el consenso general es que han superado en frecuencia a los tumores lactotropos, inicialmente considerados como los tumores hipofisarios más prevalentes^{2,18,82}. De hecho, en la serie de 1055 tumores de Mete et al³, los TH no funcionantes supusieron el 48.5% del total. En nuestra serie, el porcentaje es incluso mayor, suponiendo el 60.1%.

El término NFPA es ambiguo, porque a diferencia de los tumores funcionantes agrupa a tumores procedentes de diferentes líneas celulares hipofisarias. Por eso, algunos autores^{18,27} proponen la sustitución del término NFPA por el de tumor silente (SPA, acrónimo del inglés Silent Pituitary Adenoma), relacionando éste con su estirpe celular, es decir, tumor corticotropo silente, tumor somatotropo silente, etc. Esta definición permite diferenciar

variantes funcionantes y silentes de los distintos subtipos de TH. Las variantes silentes serían aquéllas que expresan algunas hormonas adenohipofisarias o sus factores de transcripción por IHQ pero que no presentan secreción hormonal específica clínicamente relevante^{18,27}. Esta identificación más precisa de los tumores que no asocian un cuadro endocrino reconocible, permitirá eliminar el sesgo que ha existido hasta ahora al comparar diferentes series de tumores no funcionantes. Por tanto, aunque antes de la cirugía no es posible conocer la estirpe celular de un tumor no funcionante, es recomendable que tras la misma se utilice el término silente acompañado del correspondiente subtipo en sustitución del adjetivo no funcionante previo.

En nuestra serie el 8.9% de los tumores no funcionantes fueron etiquetados por IHQ como tumores corticotropos silentes, el 5.1% y el 6.4% como somatotropos puros y mixtos silentes respectivamente, el 5.7% como lactotropos silentes, el 1.9% como tirotropos silentes y el 10.8% como tumores plurihormonales silentes, el 25.5% como gonadotropos y el 35.7% como tumores nulos. Si bien es cierto que la mayoría de los tumores silentes (gonadotropos y nulos) no tienen una variante funcionante, existe un porcentaje importante de tumores habitualmente funcionantes que sí tienen una variante silente. Similares resultados se reportan en las series de Nishioka y Mete, tipificando los TH mediante la determinación IHQ de los factores de transcripción y de las hormonas adenohipofisarias. Aunque el 99 % de los gonadotropinomas y el 100% de los tumores nulos fueron silentes, un porcentaje de tumores corticotropo (entre un 30-33%) y de tumores de la línea Pit-1 (9%) también lo fueron. Sin embargo, en las series históricas todos estos tumores aparecen juntos bajo el epígrafe NFPA, cuando el comportamiento de un tumor corticotropo silente puede ser completamente diferente al de un gonadotropo silente o al de un tumor de células nulas. Este hecho ha dificultado mucho la comparación del comportamiento tumoral entre series y dentro de las mismas series. De hecho, tal como se demuestra tanto en el estudio molecular de las hormonas adenohipofisarias del presente artículo como en el estudio molecular e IHQ de los factores de transcripción del primer artículo, algunos tumores sin diagnóstico clínico endocrino, son reclasificados de subtipo cuando se utilizan técnicas moleculares o cuando se determinan los factores de transcripción. Y los

Discusión

mismos resultados obtienen Nishioka y Mete y otras series de menor importancia publicadas con posterioridad. Por tanto, consideramos que una tipificación precisa de las variantes silentes de los distintos subtipos de TH es imprescindible para la comparación entre ellas y entre las diferentes series, y para el estudio de las vías patogénicas y de las posibles dianas terapéuticas.

Pese a lo mencionado anteriormente, para el estudio del comportamiento de los distintos tumorales en el presente estudio se utilizó su identificación IHQ en lugar de su identificación molecular. Esto fue así porque no existían precedentes de identificación de los subtipos sobre la base de la expresión molecular de las hormonas adenohipofisarias, siendo el referente la identificación IHQ de las mismas (los experimentos se realizaron antes de la publicación de la clasificación de los tumores endocrinos de la OMS 2017). Además, la identificación molecular de las variantes silentes se realizó teniendo como referencia los percentiles 25-75 de los genes correspondientes en las variantes funcionantes clínicamente diagnosticados. Por tanto, existía un claro sesgo a la hora de comparar el grado de expresión génica entre variantes funcionantes y silentes como un posible factor contributivo al silenciamiento tumoral.

Casi por definición, la mayoría de los tumores silentes, son macroadenomas. Pero dentro de los tumores no funcionantes, se ha descrito que, en comparación con los GT, los tumores de las otras líneas celulares son más grandes (linaje Pit-1), más invasivos (TN y CT) o presentan mayores tasas de recurrencia (Pit-1 y CT)³. En nuestra serie, los tumores silentes, en su conjunto, fueron significativamente más grandes y más invasivos que los que funcionantes ($p = 0.001$). Sin embargo, a diferencia de otros autores^{3,83}, no encontramos diferencias en el tamaño o la invasión entre los TN y los GT, lo que probablemente pueda atribuirse al hecho de que parte de los TN eran GT, aunque también este hecho es esperable en las series antiguas publicadas.

Tan sólo el 10.4% de los tumores de nuestra serie mostraron un carácter proliferativo, en contraste con otras series como la de Mete³ con hasta un 60% de tumores proliferativos. El carácter proliferativo de los tumores de nuestra serie se determinó exclusivamente sobre la base del índice de tinción Ki67. El hecho

que los tumores que componen la serie procedieran de cuatro departamentos de Anatomía Patológica diferentes, dificultó el uso de otros índices como el número de mitosis o la expresión de p53. En cualquier caso, la clasificación de los tumores endocrinos de la OMS 2017 continúa recomendando la determinación sistemática del índice Ki-67 y sólo cuando éste es superior al 3%, la determinación de los otros índices. Aún así, la determinación de Ki-67 no tiene en los tumores hipofisarios el mismo valor pronóstico que en otros tumores neuroendocrinos y presenta importantes limitaciones en su interpretación al ser una técnica semicuantitativa altamente dependiente del observador. Esta puede ser una de las explicaciones más probables del bajo porcentaje de tumores proliferativos encontrados en nuestra serie en comparación con otras publicadas.

Los CTs son tumores de la línea celular Tpit inmunopositivos para ACTH y TPIT, que expresan molecularmente de forma predominante los genes *POMC*, *CRHR1* o *AVPR1*. Globalmente, entre el 20% y el 35% no asocian un síndrome de Cushing^{84,85}, y constituyen aproximadamente el 5% de todos los TH⁸⁶, aunque con gran variabilidad entre series (**Tabla 3, Artículo 2**). En el presente estudio, los S-CT constituyeron el 56% de los tumores de extirpe corticotropa y el 5.2% de todos los TH cuando se identificaron por IHQ. Contrariamente a nuestros resultados, y con discrepancias entre las series publicadas, los S-CT son más frecuentes en mujeres, mientras que se diagnostican en edades más tempranas que otros subtipos silentes (**Tabla 3, Artículo 2**).

Como se ha recogido en la introducción, se han propuesto varias teorías para explicar por qué algunos CT no causan síndrome de Cushing. De ellas la más sugerente se basa en alteraciones en el procesamiento de POMC y ACTH en las células corticotropas^{20,87}. La ausencia de cambios en la expresión génica de *POMC*, *CHRH1* y *AVPR1B* de nuestra serie abunda con nuestros resultados previos⁴⁴, de que cambios en el procesamiento de ACTH son más importantes que la expresión génica de la misma o de sus hormonas hipotalámicas reguladoras en la ausencia de un síndrome de Cushing.

Discusión

Tabla 3: Series de casos de S-CT

Autor	NFPA	SEXO	EDAD (años)	TAMAÑO	INVASIÓN SC		
					Hardy grado 2	grado 3	grado 4
Cho et al 2010 ⁸⁸	28 S-CT	Hombre/Mujer =1 : 2,1	44,5 (13-67)	2,8 ± 0,8 cm	16 (57,1%)	11(39,3%)	1(3,6%)
	134 NFPA no S-CT	Hombre/Mujer =1,3 : 1	50,2 (18-79)	3,0 ± 0,9 cm	87 (64,9%)	47 (35,1)	0(0%)
		<i>p</i> = 0,042	<i>p</i> = 0,026	<i>p</i> = 0,320	<i>p</i> = 0,077	Todos macroadenomas	
Yamada et al 2007 ⁸⁹	S-CT (26/12%)	22 mujeres/ 4 hombres (85%)	52,1 ± 2,5 (35-72)		85%(22)		
	GT (136/ 64%)	41 mujeres/ 95 hombres (30%) *	54,2 ± 1,9 (35-72)		11% (15)*		
	NC (39/18%)	22 mujeres/ 17 hombres (56%) **	51,9 ± 2,3 (32-75)		38%(15)**†		
	Adenoma subtipo 3 (9/4%)	3 mujeres/ 6 hombres (33%) ***	28,3 ± 1,8 (19-34)		67% (6)‡		
	Total NFPA=213	*S-CT vs GT <i>p</i> <0,001 **S-CT vs NC <i>p</i> = 0,0172 ***S-CT vs Subtipo 3 <i>p</i> =0,0073			*S-CT vs GT <i>p</i> <0,0001 **S-CT vs NC <i>p</i> < 0,0001 ‡ NC vs GT <i>p</i> < 0,0001 ‡ Subtipo 3 vs GT <i>p</i> = 0,0002		
Nishioka et al 2015 ¹⁹	51 S-CT	M/F =12/39 (76%F)	51 ± 13 (23-81)	31,4% (16) macro gigantes (>40mm)	45,1%(23)		
	376 GT	M/F =230/146 (39%F)*	56 ± 13 (18-83)	8,2% (31) macro gigantes	5,3%(20)*		
	Total NFPA=516	* <i>p</i> < 0,0001	<i>p</i> nc	<i>p</i> nc	* <i>p</i> < 0,0001		
Langlois et al 2017 ⁹⁰	S-ST (17/2,1%)	14 mujeres (82%)*	42,8 ± 16,3*	1,52 ± 0,99 cm media* (~50% macro)	25%		
	S-CT (37/4,5%)	20 mujeres (54%)	51,1 ± 16,1	2,53 ± 1,15 cm media	43% (17/39)		
	GT (70/ 18,9%)	26 mujeres (37%)	60,0 ± 15,1**	2,87 ± 1,97 cm media	41%		
	*S-ST vs GT <i>p</i> =0,002	*S-ST vs S-CT <i>p</i> <0,001	*S-ST vs GT <i>p</i> =0,009	<i>p</i> =0,4			
		** GT vs S-CT <i>p</i> = 0,018		S-ST no diferencias con GTy S-CT			

Coopper et al 2010 ⁴⁵	25 S-CT (23%)	12 mujeres(48%)	53 ± 14,3	30 ± 17 mm (n= 17)	7 (n= 17) (41%)
	84 NFPA no S-CT (77%)	29 mujeres(35%)	54,9 ± 14,9	31 ± 13 mm (n= 58)	22 (n= 58 (38%))
				no diferencias (no p)	no diferencias (no p)
Jahngiri et al 2013 ⁹¹	S-CT (75/3%)	Mujeres 37 (49%)	50 (19-83)	2,2 cm (0,6-4,8) - 3% micro (1/39)	30%(16/54)
	NFA control (1726)	Mujeres 890 (52,%)*	49 (9-89)*	2 cm (0,3-6,1)* - 13% micro (218/1726)	18% (297/1655)*
	F-CT (134/6%)	Mujeres 114 (85%) **	39 (10-77)**	0,9 cm	
		*S-CT vs NFPA p=0,7 **S-CT vs F-CT p<0,001	*S-CT vs NFPA p=0,9 **S-CT vs F-CT p<0,001	*S-CT vs NFPA p=0,2	*S-CT vs NFPA p=0,03 ;
Alahmadi et al 2012 ⁸⁴	20 S-CT	56%(11 mujeres)	51,1	3,5 cm	31%
	30 NFPA (GT+NC)	53%(16 mujeres)	51,5	5,95 cm	23%
		p= 0,85	p= 0,93	p= 0,074	p= 0,475
Cohen-Inbar et al 2017 ⁹²	50 S-CT (14%)	M:F 19:29 (40:60%)	50,9	3,3	38 (77,6%)
	307 NFPA no S-CT (86%)	M:F 137:129 (52:48%)	55,1	3,1	210 (70,9%)
		p= 0,173	p= 0,06	p= 0,359	p= 0,434
Ioachemiscu et al 2012 ⁹³	33 S-CT (21%)	M/F 19/14 (42,4% mujeres)	49,6 ± 14,1	2,83 ± 0,97	45,5% (15)
	126 NFPA no S-CT (79%)	M/F 72/54 (42,9% mujeres)	55,6 ± 12,8	2,84 ± 0,99	30,2% (38)
		p= 0,96	p= 0,02	p= 0,98	p= 0,09
				Todos macroadenomas	
Torregrosa et al 2020	14 S-CT (5,2%)	6 Mujeres (46,2%)*	42,5 ± 15,13*	Macro 14 (73,7%)*	6 (63,6%)*
	11 F-CT (4,1%9)	7 Mujeres (53,8%)	40,27 ± 10,98	Macro 5 (26,3%)	4 (36,4%)
	40 GT (14,9%)	17 mujeres (42,5%)	54,75 ± 14,51	Macro 40 (100 %)	29 (72,5%)
	*S-CT vs F-CT p=0,3	*S-CT vs F-CT p=0,762	*S-CT vs F-CT p<0,001	*S-CT vs F-CT p=0,494	

NFPA: tumor hipofisario no funcionante; SC: Seno cavernoso; S-CT, tumor corticotropo silente; F-CT, tumor corticotropo funcionante; GT, tumor gonadotropo; NC, tumor de células nulas o null cell; S-ST, tumor somatotropo silente. M, Hombres; F, Mujeres; Macro, macroadenomas; Micro, microadenomas; nc, no consta.

Referente a los tumores somatotropos silentes, se trata de tumores que presentan inmunotinción positiva para GH en ausencia de acromegalia. Su prevalencia se ha estimado en aproximadamente el 2% de todos los TH^{90,94}. En el presente estudio, los S-ST constituyeron el 3% de todos los TH y el 17.7% de los ST diagnosticados por la IHQ de las hormonas adenohipofisarias. Sin embargo, su prevalencia se redujo al 0.4% de todos los TH y al 2.7% de los tumores de estirpe somatotropa cuando se identificaron mediante RT-qPCR. Con frecuencia, los S-ST son plurihormonales⁹⁵. Es probable pues que la discrepancia entre la identificación IHQ y la génica (RT-qPCR) pueda atribuirse a reacción cruzada entre los anticuerpos frente a GH y la subunidad α o la prolactina. Los S-ST son más frecuentes en mujeres y se diagnostican a edades más tempranas que otros subtipos silente^{90,95}. En nuestra serie, la edad en el momento del diagnóstico también fue menor que la de otros subtipos, con la excepción de los S-CT, aunque la prevalencia fue mayor en los hombres.

La mayor parte de los S-ST son tumores pobremente granulados y por tanto con menor capacidad de secreción de GH que los densamente granulados⁹⁵, lo que podría justificar la ausencia del síndrome clínico de la Acromegalia. Nuestros resultados, con una expresión del gen *GH* significativamente menor en los ST silentes que en los funcionantes abundan en este sentido ($p < 0.001$) (**Figura 1. Artículo 2**)²⁷. Pero también se han planteado otras hipótesis, como un procesamiento post-transcripcional defectuoso de GH^{46,47}, o una baja actividad biológica de la GH secretada^{47,48}. Lamentablemente el diseño y objetivos de la presente investigación no permiten profundizar en ellas.

A pesar de que los tumores lactotropos se consideran uno de los subtipos de TH más frecuentes, rara vez se reportan sus variantes silentes (S-LT). Previamente a la cirugía, se comportan como NFPA con concentraciones normales o ligeramente elevadas de PRL, siendo difícil su diferenciación de la hiperprolactinemia relacionada con la compresión de las vías dopaminérgicas.

Por lo tanto, el diagnóstico se establece tras la cirugía. Su prevalencia entre los tumores silentes se ha estimado entre el 0.6% y el 1.6%^{96,97}. En la presente serie, los S-LT representaron el 5.6% de todos los TH silentes identificados por IHQ y el 45% de los tumores de estirpe lactotropa. Debido a la escasez de resultados publicados no es posible comparar nuestros resultados con los de otros autores, pero fueron más prevalentes en mujeres y se diagnosticaron a mayor edad (64.4 ± 13.4 años) que los funcionantes. No hay datos publicados en la literatura referentes a los mecanismos de silenciamiento de estos tumores. En nuestro estudio, de forma similar a los ST, los LT silentes puros expresaron menos *PRL* que los LT funcionantes pudiendo contribuir a una menor secreción de *PRL*, aunque no se encontraron una correlación entre el Fold Change de expresión génica y las concentraciones circulantes de *PRL* (**Tabla 2, Artículo 2**).

Con frecuencia los tumores silentes con inmunotinción GH-positiva presentan además tinción positiva de *PRL* y se consideran tumores somatotropos-lactotropos mixtos silentes (S-ST mixtos). Los tumores somatotropos-lactotropos mixtos proceden de células somatotropas densamente granuladas (acidófilas en la tinción H-E) y de células lactotropas escasamente granuladas (cromóforas)⁹⁸. En nuestra serie de 268 tumores, los S-ST mixtos representaron el 6.2% de todos los TH silentes (identificados por IHQ de las hormonas) y se diferenciaron claramente de los S-LT puros. En una reciente revisión de 94 casos de acromegalia no se encontraron diferencias en la distribución por sexos ni en la edad del diagnóstico entre los ST puros, los mamomasomatotropos y los ST mixtos⁹⁹. En nuestra serie fueron más prevalentes en hombres y se diagnosticaron a edades más tempranas que los LT puros ($47,7 \pm 13,14$ años). La expresión de *GH* fue menor que en su correspondiente variante funcionante, pudiendo este hecho contribuir nuevamente a la ausencia de síntomas endocrinos en estos tumores (**Figura 1, Artículo 2**).

Los tumores tirotrópicos silentes han sido escasamente reportados. Su prevalencia dentro de los tumores de la línea tirotrópica osciló entre el 31% y 75% en dos estudios independientes^{100,101}. La mayor parte son macroadenomas, y su distribución por sexo varía según las series sin un claro dimorfismo sexual¹⁰⁰. En nuestra serie, comprendieron el 1.8% del total de TH silentes y el 75% de los tumores de la línea celular tirotrópica TSH. Debido a su bajo número, no pudimos

Discusión

establecer comparaciones entre silentes y funcionantes, pero los tres tirotrópos silentes fueron macroadenomas, aunque sólo uno de ellos fue invasivo, todos fueron hombres y su edad de diagnóstico fue superior al único caso funcionante. Al igual que en sus predecesores, no se conocen las causas últimas del silenciamiento clínico. Aún así, se conoce que el porcentaje de células que expresan *TSHβ* en los tirotrópinomas varía ampliamente, siendo mayor su expresión en los tumores funcionantes que en los silentes¹⁰⁰. Coincidiendo con estos datos, en la presente serie la expresión media de *TSH* en el único F-TT (3,67) fue mayor que en los 3 S-TT ($2,0.6 \pm 3,47$), pudiendo contribuir, al igual que en la mayoría de tumores hipofisarios silentes a su baja expresión clínica.

Finalmente, como ya se ha comentado, los tumores plurihormonales son raros y se limitan a unos pocos casos documentados. Una de las limitaciones en su identificación es la dificultad de diferenciar el tejido tumoral de la posible contaminación con tejido hipofisario normal. Por tanto, requieren de un análisis cuidadoso. Pueden presentar síntomas de tumores no funcionantes o características clínicas de tumores secretores^{41,77,102}. El estudio de los factores de transcripción específicos de las líneas celulares hipofisarias ha permitido una tipificación más precisa de los mismos, reclasificándolos en ocasiones en otros subtipos de TH. En la serie de Aydin et al (2019)¹⁰³, analizando los factores de transcripción en 665 TH, la prevalencia fue del 4.5% (33.3% PH Pit-1 y 66.7% PHU), el 85.2% fueron silentes, la edad media fue de 44 ± 15.3 , con predominio de varones (59.3%) y de macroadenomas (88.8%) y el 44.4% presentaron invasión del seno cavernoso. En nuestra serie, la frecuencia de tumores PH (PH Pit-1 y PHU) fue del 12.6% (molecularmente) y del 13.4% (por IHQ). A diferencia de los resultados Aydin, encontramos predominio en mujeres y un menor porcentaje de silentes (50%) (**Tabla 2, Artículo 2**). En los S-PH se observó mayor edad media, un porcentaje superior de macroadenomas y de invasión que en los funcionantes, sin diferencias en el género. Referente a los posibles mecanismos de silenciamiento, los S-PH mostraron mayor expresión génica de *FSH* que los funcionantes y menor expresión génica de *PRL*, *POMC*, *AVPR1B*, lo que abunda en la heterogeneidad de este subtipo tumoral.

En resumen se observan diferencias en las frecuencias de los distintos subtipos de TH entre la identificación IHQ y la identificación molecular de las

hormonas adenohipofisarias, especialmente en los tumores gonadotropos y los nulos coincidiendo con resultados del estudio de los factores de transcripción. Además los tumores silentes fueron más grandes y más invasivos que sus variantes funcionantes, aunque no hubo diferencias en la actividad proliferativa. El estudio comparativo de la expresión génica de las hormonas hipofisarias entre los tumores funcionantes y los silentes, muestra una mayor expresión en las variantes funcionantes que en las silentes en la mayoría de los subtipos.

Limitaciones

La principal limitación, común a ambas publicaciones, se debe al hecho de que, ocasionalmente, los estudios moleculares e inmunohistoquímicos pudieron realizarse en diferentes áreas del mismo tumor.

Además, la inclusión de muestras con tejido hipofisario normal ha dificultado la interpretación de los datos moleculares en algunos casos. Sin embargo, las muestras con dudas importantes con respecto a la contaminación fueron excluidas del estudio.

Se excluyeron además aquellas muestras en las que no hubo suficiente cantidad/calidad de material para el estudio molecular e inmunohistoquímico, y los casos con ausencia de datos clínicos, bioquímicos o radiológicos fehacientemente contrastados.

Otra limitación es que los estudios anatomopatológicos para la clasificación IHQ de la serie global (Artículo 2), fueron realizados en diferentes centros lo que condicionó que la identificación de tumores dependiera de la técnica empleada y del observador.

Además la baja prevalencia de determinados subtipos de TH impidió realizar comparaciones entre los tumores funcionantes y silentes.

Conclusiones

1. El estudio molecular de la expresión génica de los factores de transcripción hipofisarios específicos permite una mejor tipificación de los TH, reduciendo significativamente el porcentaje de tumores nulos, reclasificados en su mayoría como gonadotropos.
2. El estudio molecular complementa el estudio de IHQ en la tipificación adecuada de los tumores PH Pit-1 y PHU.
3. La identificación de los tumores hipofisarios sobre la base de la expresión molecular de las hormonas adenohipofisarias reduce de forma significativa el porcentaje de tumores nulos identificados inmunohistoquímicamente, coincidiendo con los resultados del estudio de los factores de transcripción.
4. Los tumores silentes son más grandes y más invasivos que sus variantes funcionantes. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en la actividad proliferativa.
5. El estudio comparativo de la expresión génica de las hormonas hipofisarias entre los tumores funcionantes y los silentes, muestra una mayor expresión en las variantes funcionantes que en las silentes en algunos pero no en todos los subtipos.

Futuras líneas de investigación

La línea de investigación desarrollada ha dado lugar, además de las publicaciones que componen la presente tesis doctoral, a las siguientes publicaciones adicionales:

1. García-Martínez A, Cano DA, Flores-Martínez A, J Gil J, Puig-Domingo M, Webb S N, Soto-Moreno A, Picó A. Why don't corticotroph tumors always produce Cushing's disease?. *Eur J Endocrinol.* 2019;181(3):351-361. doi:10.1530/EJE-19-0338. Factor de impacto: 5.308. **Q1**.
2. García-Martínez A, Sottile J, Sánchez-Tejada L, Fajardo C, Cámara R, Lamas C, Barberá VM, Picó A. DNA Methylation of Tumor Suppressor Genes in Pituitary Neuroendocrine Tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(4):1272-1282. doi:10.1210/jc.2018-01856. Factor de impacto: 5.399. **Q1**.
3. Araceli García-Martínez, Beatriz López-Muñoz, Carmen Fajardo, Rosa Cámara, Cristina Lamas, Sandra Silva-Ortega, Ignacio Aranda, Antonio Picó. Increased *E2F1* mRNA and miR-17-5p Expression Is Correlated to Invasiveness and Proliferation of Pituitary Neuroendocrine Tumours. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(4):227. Published 2020 Apr 16. doi:10.3390/diagnostics10040227. Factor de impacto: 3.11. **Q1**.
4. García-Martínez, A.; Fuentes-Fayos, A.C.; Fajardo, C.; Lamas, C.; Cámara, R.; López-Muñoz, B.; Aranda, I.; Luque, R.M.; Picó, A. Differential Expression of MicroRNAs in Silent and Functioning Corticotroph Tumors. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 1838. Factor de impacto: 3.303. **Q1**.
5. Martínez-López S, García-Martínez A, Torregrosa-Quesada ME, López-Muñoz B, Cámara R, Fajardo C, Lamas C, Picó A. Is Somatostatin Receptor and Dopamine Receptor profiling useful in the management of silent somatotroph tumors?. *J Endocrinol Invest.* 2020 Jun; 43(6):859-863. doi: 10.1007/s40618-019-01166-8. Epub 2020 Jan 2. Factor de impacto: 3.397. **Q2**.

Bibliografía

1. Asa SL, Casar-Borota O, Chanson P, et al. From pituitary adenoma to pituitary neuroendocrine tumor (PitNET): an International Pituitary Pathology Club proposal. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(4):C5-C8. doi:10.1530/ERC-17-0004
2. Aflorei ED, Korbonits M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 2014;117(3):379-394. doi:10.1007/s11060-013-1354-5
3. Mete O, Cintosun A, Pressman I, Asa SL. Epidemiology and biomarker profile of pituitary adenohypophysial tumors. *Mod Pathol*. 2018;31(6):900-909. doi:10.1038/s41379-018-0016-8
4. GOLD EB. EPIDEMIOLOGY OF PITUITARY ADENOMAS. *Epidemiol Rev*. 1981;3(1):163-183. doi:10.1093/oxfordjournals.epirev.a036232
5. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, et al. The prevalence of pituitary adenomas: A systematic review. *Cancer*. 2004;101(3):613-619. doi:10.1002/cncr.20412
6. Tjörnstrand A, Gunnarsson K, Evert M, et al. The incidence rate of pituitary adenomas in western Sweden for the period 2001–2011. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(4):519-526. doi:10.1530/EJE-14-0144
7. Agustsson TT, Baldvinsdottir T, Jonasson JG, et al. The epidemiology of pituitary adenomas in Iceland, 1955-2012: a nationwide population-based study. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(5):655-664. doi:10.1530/EJE-15-0189
8. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1603-1618. doi:10.1172/JCI20401
9. Caimari F, Korbonits M. Novel Genetic Causes of Pituitary Adenomas. *Clin Cancer Res*. 2016;22(20):5030-5042. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0452
10. Salomon MP, Wang X, Marzese DM, et al. The epigenomic landscape of pituitary adenomas reveals specific alterations and differentiates among acromegaly, Cushing's disease and endocrine-inactive subtypes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(17):4126-4136. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2206
11. Sapochnik M, Nieto LE, Fuertes M, Arzt E. Molecular Mechanisms Underlying Pituitary Pathogenesis. *Biochem Genet*. 2016;54(2):107-119. doi:10.1007/s10528-015-9709-6
12. FUKUOKA H, TAKAHASHI Y. The Role of Genetic and Epigenetic Changes in Pituitary Tumorigenesis. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014;54(12):943-957. doi:10.2176/nmc.ra.2014-0184
13. Peverelli E, Mantovani G, Lania AG, Spada A. cAMP in the pituitary: An old messenger for multiple signals. *J Mol Endocrinol*. 2013;52(1). doi:10.1530/JME-13-0172
14. Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(5):257-266. doi:10.1038/nrendo.2011.40

Bibliografía

15. Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. Genetic and epigenetic mutations of tumor suppressive genes in sporadic pituitary adenoma. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;386(1-2):16-33. doi:10.1016/j.mce.2013.09.006
16. García-Martínez A, Fuentes-Fayos AC, Fajardo C, et al. Differential Expression of MicroRNAs in Silent and Functioning Corticotroph Tumors. *J Clin Med.* 2020;9(6):1838. doi:10.3390/jcm9061838
17. García-Martínez A, Sottile J, Sá Nchez-Tejada L, et al. DNA Methylation of tumor suppressor genes in pituitary neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(4):1272-1282. doi:10.1210/jc.2018-01856
18. Drummond J, Roncaroli F, Grossman AB, Korbonits M. Clinical and Pathological Aspects of Silent Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(7):2473-2489. doi:10.1210/jc.2018-00688
19. Nishioka H, Inoshita N, Mete O, et al. The Complementary Role of Transcription Factors in the Accurate Diagnosis of Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol.* 2015;26(4):349-355. doi:10.1007/s12022-015-9398-z
20. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, et al. Differential gene expression in ACTH - secreting and non-functioning pituitary tumors. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(6):717-724. doi:10.1530/EJE-07-0428
21. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Akashi T, Ohno K, Hirata Y. Defective expression of prohormone convertase 1/3 in silent corticotroph adenoma. *Endocr J.* 2007;54(5):777-782. doi:10.1507/endocrj.K07-059
22. Raverot G, Wierinckx A, Jouanneau E, et al. Clinical, hormonal and molecular characterization of pituitary ACTH adenomas without (silent corticotroph adenomas) and with Cushing's disease. *Eur J Endocrinol.* 2010;163(1):35-43. doi:10.1530/EJE-10-0076
23. Tani Y, Sugiyama T, Izumiyama H, Yoshimoto T, Yamada S, Hirata Y. Differential gene expression profiles of POMC-related enzymes, transcription factors and receptors between non-pituitary and pituitary ACTH-secreting tumors. *Endocr J.* 2011;58(4):297-303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383526>. Accessed February 1, 2018.
24. McDonald WC, Banerji N, McDonald KN, Ho B, Macias V, Kajdacsy-Balla A. Steroidogenic Factor 1, Pit-1, and Adrenocorticotrophic Hormone: A Rational Starting Place for the Immunohistochemical Characterization of Pituitary Adenoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141(1):104-112. doi:10.5858/arpa.2016-0082-OA
25. Miyai S, Yoshimura S, Iwasaki Y, Takekoshi S, Lloyd R V, Osamura RY. Induction of GH, PRL, and TSH beta mRNA by transfection of Pit-1 in a human pituitary adenoma-derived cell line. *Cell Tissue Res.* 2005;322(2):269-277. doi:10.1007/s00441-005-0033-z

26. Lee JC, Pekmezci M, Lavezo JL, et al. Utility of Pit-1 Immunostaining in Distinguishing Pituitary Adenomas of Primitive Differentiation from Null Cell Adenomas. *Endocr Pathol.* 2017;28(4):287-292. doi:10.1007/s12022-017-9503-6
27. Cooper O, Melmed S. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: the silent tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(4):447-460. doi:10.1016/j.beem.2012.01.002
28. Greenman Y, Stern N. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(5):625-638. doi:10.1016/j.beem.2009.05.005
29. Vargas G, Gonzalez B, Ramirez C, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of 485 patients with nonfunctioning pituitary macroadenomas. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:756069. doi:10.1155/2015/756069
30. Ntali G, Wass JA. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary.* 2018;21(2):111-118. doi:10.1007/s11102-018-0869-3
31. Chen L, White WL, Spetzler RF, Xu B. A prospective study of nonfunctioning pituitary adenomas: presentation, management, and clinical outcome. *J Neurooncol.* 2011;102(1):129-138. doi:10.1007/s11060-010-0302-x
32. Gruppeta M, Mercieca C, Vassallo J. Prevalence and incidence of pituitary adenomas: A population based study in Malta. *Pituitary.* 2013;16(4):545-553. doi:10.1007/s11102-012-0454-0
33. Vézina JL, Hardy J, Yamashita M. [Microadenomas and hypersecreting pituitary adenomas]. *Arq Neuropsiquiatr.* 1975;33(2):119-127. doi:10.1590/s0004-282x1975000200002
34. Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C. Pituitary Adenomas with Invasion of the Cavernous Sinus Space. *Neurosurgery.* 1993;33(4):610-618. doi:10.1097/00006123-199310000-00008
35. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU EC. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs WHO/IARC Classification of Tumours, 3rd Edition, Volume 8;* 2004.
36. Trouillas J, Vasiljevic A, Lapoirie M, Chinezu L, Jouanneau E, Raverot G. Pathological markers of somatotroph pituitary neuroendocrine tumors predicting the response to medical treatment. *Minerva Endocrinol.* 2019;44(2):129-136. doi:10.23736/S0391-1977.18.02933-4
37. McCormack A, Dekkers OM, Petersenn S, et al. Treatment of aggressive pituitary tumours and carcinomas: Results of a European Society of Endocrinology (ESE) survey 2016. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(3):265-276. doi:10.1530/EJE-17-0933
38. Sanchez-Tejada L, Sanchez-Ortiga R, Lamas C, et al. Contribution of molecular analysis to the typification of the non-functioning pituitary adenomas. Luque RM, ed. *PLoS One.* 2017;12(7):e0180039. doi:10.1371/journal.pone.0180039

Bibliografía

39. García-Martínez A, Sottile J, Fajardo C, et al. Is it time to consider the expression of specific-pituitary hormone genes when typifying pituitary tumours? *PLoS One*. 2018;13(7). doi:10.1371/journal.pone.0198877
40. Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G RJ. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. Fourth Edition - WHO - OMS -. WHO Classification of Tumours of Endocrine Glands. 4th ed. Lyon:IARC. <https://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4010#%0Ahttp://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4010>. Published 2017. Accessed December 10, 2019.
41. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathol*. 2017;134(4):521-535. doi:10.1007/s00401-017-1769-8
42. Kovacs K, Horvath E, Bayley TA, Hassaram ST, Ezrin C. Silent corticotroph cell adenoma with lysosomal accumulation and crinophagy. A distinct clinicopathologic entity. *Am J Med*. 1978;64(3):492-499. doi:10.1016/0002-9343(78)90236-X
43. Seltzer J, Ashton CE, Scotton TC, Pangal D, Carmichael JD, Zada G. Gene and protein expression in pituitary corticotroph adenomas: A systematic review of the literature. *Neurosurg Focus*. 2015;38(2). doi:10.3171/2014.10.FOCUS14683
44. García-Martínez A, Cano DA, Flores-Martínez A, et al. Why don't corticotroph tumors always produce Cushing's disease? *Eur J Endocrinol*. 2019;181(3):351-361. doi:10.1530/EJE-19-0338
45. Cooper O, Ben-Shlomo A, Bonert V, Bannykh S, Mirocha J, Melmed S. Silent corticogonadotroph adenomas: clinical and cellular characteristics and long-term outcomes. *Horm Cancer*. 2010;1(2):80-92. doi:10.1007/s12672-010-0014-x
46. Kovacs K, Lloyd R, Horvath E, et al. Silent somatotroph adenomas of the human pituitary. A morphologic study of three cases including immunocytochemistry, electron microscopy, in vitro examination, and in situ hybridization. *Am J Pathol*. 1989;134(2):345-353.
47. Trouillas J, Sassolas G, Loras B, et al. Somatotropic Adenomas without Acromegaly. *Pathol Res Pract*. 1991;187(8):943-949. doi:10.1016/S0344-0338(11)81065-4
48. Yamada S, Aiba T, Sano T, et al. Growth hormone-producing pituitary adenomas: correlations between clinical characteristics and morphology. *Neurosurgery*. 1993;33(1):20-27. doi:10.1227/00006123-199307000-00003
49. Pease M, Ling C, Mack WJ, Wang K, Zada G. The Role of Epigenetic Modification in Tumorigenesis and Progression of Pituitary Adenomas: A Systematic Review of the Literature. Zhu W-G, ed. *PLoS One*. 2013;8(12):e82619. doi:10.1371/journal.pone.0082619

50. Ling C, Pease M, Shi L, et al. A Pilot Genome-Scale Profiling of DNA Methylation in Sporadic Pituitary Macroadenomas: Association with Tumor Invasion and Histopathological Subtype. Tost J, ed. *PLoS One*. 2014;9(4):e96178. doi:10.1371/journal.pone.0096178
51. Raverot G, Burman P, McCormack A, et al. European society of endocrinology clinical practice guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas. *Eur J Endocrinol*. 2018;178(1):G1-G24. doi:10.1530/EJE-17-0796
52. Al-Shraim M, Asa SL. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: What is new? *Acta Neuropathol*. 2006;111(1):1-7. doi:10.1007/s00401-005-1093-6
53. Kovacs K, Horvath E, Ryan N, Ezrin C. Null cell adenoma of the human pituitary. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1980;387(2):165-174. doi:10.1007/BF00430697
54. Kontogeorgos G, Thodou E. The gonadotroph origin of null cell adenomas. *Hormones*. 2016;15(2):243-247. doi:10.14310/horm.2002.1652
55. Asa SL, Gerrie BM, Singer W, Horvath E, Kovacs K, Smyth HS. Gonadotropin secretion in vitro by human pituitary null cell adenomas and oncocytomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;62(5):1011-1019. doi:10.1210/jcem-62-5-1011
56. Báz E, Saeger W, Uhlig H, Fehr S, Lüdecke DK. HGH, PRL and β HCG/ β LH gene expression in clinically inactive pituitary adenomas detected by in situ hybridization. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1991;418(5):405-410. doi:10.1007/BF01605926
57. Schmid M, Münscher A, Saeger W, Schreiber S, Lüdecke DK. Pituitary hormone mRNA in null cell adenomas and oncocytomas by in situ hybridization comparison with immunohistochemical and clinical data. *Pathol Res Pract*. 2001;197(10):663-669. doi:10.1078/0344-0338-00143
58. Asa SL, Bamberger AM, Cao B, Wong M, Parker KL, Ezzat S. The transcription activator steroidogenic factor-1 is preferentially expressed in the human pituitary gonadotroph. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(6):2165-2170. doi:10.1210/jcem.81.6.8964846
59. Ikuyama S, Ohe K, Sakai Y, et al. Follicle stimulating hormone- β subunit gene is expressed in parallel with a transcription factor Ad4BP/SF-1 in human pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996;45(2):187-193. doi:10.1046/j.1365-2265.1996.d01-1555.x
60. Umeoka K, Sanno N, Osamura RY, Teramoto A. Expression of GATA-2 in human pituitary adenomas. *Mod Pathol*. 2002;15(1):11-17. doi:10.1038/modpathol.3880484
61. Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, et al. Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell*. 1999;97(5):587-598. doi:10.1016/s0092-8674(00)80770-9

Bibliografía

62. Gordon DF, Lewis SR, Haugen BR, et al. Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24339-24347. doi:10.1074/jbc.272.39.24339
63. Poulin G, Turgeon B, Drouin J. NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol.* 1997;17(11):6673-6682. doi:10.1128/mcb.17.11.6673
64. Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, et al. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell.* 2001;104(6):849-859. doi:10.1016/S0092-8674(01)00282-3
65. Vallette-Kasic S, Figarella-Branger D, Grino M, et al. Differential regulation of proopiomelanocortin and pituitary-restricted transcription factor (TPIT), a new marker of normal and adenomatous human corticotrophs. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(7):3050-3056. doi:10.1210/jc.2002-021934
66. Radovick S, Nations M, Du Y, Berg LVA, Weintraub BD, Wondisford FE. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science (80-)*. 1992;257(5073):1115-1118. doi:10.1126/science.257.5073.1115
67. Rosenfeld MG. POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev.* 1991;5(6):897-907. doi:10.1101/gad.5.6.897
68. Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, et al. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* 1990;4(5):695-711. doi:10.1101/gad.4.5.695
69. Yamada S, Takahashi M, Hara M, et al. Pit-1 gene expression in human pituitary adenomas using the reverse transcription polymerase chain reaction method. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996;45(3):263-272. doi:10.1046/j.1365-2265.1996.00812.x
70. Erickson D, Scheithauer B, Atkinson J, et al. Silent subtype 3 pituitary adenoma: a clinicopathologic analysis of the Mayo Clinic experience. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(1):92-99. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03514.x
71. Horvath E, Kovacs K, Smyth HS, et al. A novel type of pituitary adenoma: morphological features and clinical correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;66(6):1111-1118. doi:10.1210/jcem-66-6-1111
72. Kontogeorgos G, Scheithauer BW, Horvath E, et al. Double adenomas of the pituitary: a clinicopathological study of 11 tumors. *Neurosurgery.* 1992;31(5):840-9; discussion 849. doi:10.1227/00006123-199211000-00003
73. Mazarakis N, Kontogeorgos G, Kovacs K, Horvath E, Borboli N, Piaditis G. Composite somatotroph - ACTH-immunoreactive pituitary adenoma with transformation of hyperplasia to adenoma. *Pituitary.* 2001;4(4):215-221. doi:10.1023/A:1020764013137

74. Rajendran R, Naik S, Sandeman DD, Nasruddin AB. Pasireotide therapy in a rare and unusual case of plurihormonal pituitary macroadenoma. *Endocrinol Diabetes Metab Case Reports*. 2013;2013. doi:10.1530/edm-13-0026
75. Eytan S, Kim K-Y, Bleich D, Raghuwanshi M, Eloy JA, Liu JK. Isolated double pituitary adenomas: A silent corticotroph adenoma and a microprolactinoma. *J Clin Neurosci*. 2015;22(10):1676-1678. doi:10.1016/j.jocn.2015.03.040
76. Meij BP, Lopes MBS, Vance ML, Thorner MO, Laws ER. Double pituitary lesions in three patients with Cushing's disease. *Pituitary*. 2000;3(3):159-168. doi:10.1023/A:1011499609096
77. Villa A, Cervasio M, Del Basso De Caro M, Cavallo LM. A rare case of ACTH-LH plurihormonal pituitary adenoma: letter to the editor. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014;156(7):1389-1391. doi:10.1007/s00701-014-2027-7
78. Kageyama K, Ikeda H, Nigawara T, Sakihara S, Suda T. Expression of adrenocorticotrophic hormone, prolactin and transcriptional factors in clinically nonfunctioning pituitary adenoma. *Endocr J*. 2007;54(6):961-968. doi:10.1507/endocrj.K07E-030
79. Shupnik MA, Pitt LK, Soh AY, Anderson A, Lopes MB, Laws ER. Selective expression of estrogen receptor alpha and beta isoforms in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(11):3965-3972. doi:10.1210/jcem.83.11.5236
80. Chaidarun SS, Swearingen B, Alexander JM. Differential Expression of Estrogen Receptor- β (ER β) in Human Pituitary Tumors: Functional Interactions with ER α and a Tumor-Specific Splice Variant 1 . *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(9):3308-3315. doi:10.1210/jcem.83.9.5128
81. Chaidarun SS, Swearingen B, Alexander JM. Differential expression of estrogen receptor-beta (ER beta) in human pituitary tumors: functional interactions with ER alpha and a tumor-specific splice variant. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(9):3308-3315. doi:10.1210/jcem.83.9.5128
82. Mindermann T, Wilson CB. Age-related and gender-related occurrence of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994;41(3):359-364. doi:10.1111/j.1365-2265.1994.tb02557.x
83. Balogun JA, Monsalves E, Juraschka K, et al. Null cell adenomas of the pituitary gland: an institutional review of their clinical imaging and behavioral characteristics. *Endocr Pathol*. 2015;26(1):63-70. doi:10.1007/s12022-014-9347-2
84. Alahmadi H, Lee D, Wilson JR, et al. Clinical features of silent corticotroph adenomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 2012;154(8):1493-1498. doi:10.1007/s00701-012-1378-1
85. Cooper O. Silent corticotroph adenomas. *Pituitary*. 2015;18(2):225-231. doi:10.1007/s11102-014-0624-3

Bibliografía

86. Langlois F, Lim DST, Yedinak CG, et al. Predictors of silent corticotroph adenoma recurrence; a large retrospective single center study and systematic literature review. *Pituitary*. 2018;21(1):32-40. doi:10.1007/s11102-017-0844-4
87. Raverot G, Wierinckx A, Jouanneau E, et al. Clinical, hormonal and molecular characterization of pituitary ACTH adenomas without (silent corticotroph adenomas) and with Cushing's disease. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(1):35-43. doi:10.1530/EJE-10-0076
88. Cho HY, Cho SW, Kim SW, Shin CS, Park KS, Kim SY. Silent corticotroph adenomas have unique recurrence characteristics compared with other nonfunctioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(5):648-653. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03673.x
89. Yamada S, Ohyama K, Taguchi M, et al. A study of the correlation between morphological findings and biological activities in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery*. 2007;61(3):580-4-5. doi:10.1227/01.NEU.0000290906.53685.79
90. Langlois F, Lim DST, Varlamov E, et al. Clinical profile of silent growth hormone pituitary adenomas; higher recurrence rate compared to silent gonadotroph pituitary tumors, a large single center experience. *Endocrine*. 2017;58(3):528-534. doi:10.1007/s12020-017-1447-6
91. Jahangiri A, Wagner JR, Pekmezci M, et al. A comprehensive long-term retrospective analysis of silent corticotrophic adenomas vs hormone-negative adenomas. *Neurosurgery*. 2013;73(1):8-17. doi:10.1227/01.neu.0000429858.96652.1e
92. Cohen-Inbar O, Xu Z, Lee C chia, et al. Prognostic significance of corticotroph staining in radiosurgery for non-functioning pituitary adenomas: a multicenter study. *J Neurooncol*. 2017;135(1):67-74. doi:10.1007/s11060-017-2520-y
93. Ioachimescu AG, Eiland L, Chhabra VS, et al. Silent corticotroph adenomas: Emory University cohort and comparison with ACTH-negative nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery*. 2012;71(2):296-303; discussion 304. doi:10.1227/NEU.0b013e318257c1f0
94. Chinezu L, Jouanneau E, Vasiljevic A, Trouillas J, Raverot G. Silent GH pituitary tumor: diagnostic and therapeutic challenges. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2013;74(5-6):491-495. doi:10.1016/j.ando.2013.09.003
95. Chinezu L, Vasiljevic A, Trouillas J, Lapoirie M, Jouanneau E, Raverot G. Silent somatotroph tumour revisited from a study of 80 patients with and without acromegaly and a review of the literature. *Eur J Endocrinol*. 2017;176(2):195-201. doi:10.1530/EJE-16-0738
96. Saeger W, Ludecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ, Petersenn S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol*. 2007;156(0804-4643 (Print)):203-216.

97. Tampourlou M, Ntali G, Ahmed S, et al. Outcome of Nonfunctioning Pituitary Adenomas That Regrow After Primary Treatment: A Study From Two Large UK Centers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(6):1889-1897. doi:10.1210/jc.2016-4061
98. Mete O, Asa SL. Clinicopathological correlations in pituitary adenomas. *Brain Pathol.* 2012;22(4):443-453. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00599.x
99. Lv L, Jiang Y, Yin S, et al. Mammotroph and mixed somatotroph-lactotroph adenoma in acromegaly: a retrospective study with long-term follow-up. *Endocrine.* 2019;66(2):310-318. doi:10.1007/s12020-019-02029-1
100. Kirkman MA, Jaunmuktane Z, Brandner S, Khan AA, Powell M, Baldeweg SE. Active and silent thyroid-stimulating hormone-expressing pituitary adenomas: presenting symptoms, treatment, outcomes, and recurrence. *World Neurosurg.* 2014;82(6):1224-1231. doi:10.1016/j.wneu.2014.03.031
101. Wang EL, Qian ZR, Yamada S, et al. Clinicopathological Characterization of TSH-Producing Adenomas: Special Reference to TSH-immunoreactive but Clinically Non-functioning Adenomas. *Endocr Pathol.* 2009;20(4):209-220. doi:10.1007/s12022-009-9094-y
102. Rasul FT, Jaunmuktane Z, Khan AA, Phadke R, Powell M. Plurihormonal pituitary adenoma with concomitant adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and growth hormone (GH) secretion: a report of two cases and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien).* 2014;156(1):141-146. doi:10.1007/s00701-013-1890-y
103. Aydin S, Comunoglu N, Ahmedov ML, et al. Clinicopathologic Characteristics and Surgical Treatment of Plurihormonal Pituitary Adenomas. *World Neurosurg.* 2019;130:e765-e774. doi:10.1016/j.wneu.2019.06.217

Anexos

ANEXO I:

Tabla Suplementaria Artículo 1

Case	Age (years)	Sex	CSI	Tumoral Size	Clinical phenotype	GH	FSH	LH	TSH	PRL	POMC	AVPR1b	CRHR1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific hormone genes	TBX19	NEUROD1	POU1F1	ESKI	GATA2	SF-1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific transcription factor genes	Subtypes based on IHC of pituitary-specific hormones	Subtypes based on IHC of pituitary-specific transcription factors
1	33	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.001	0	0.001	0	0.003	13,955	83,248	29,691	Silent corticotroph	4,941	0	0.001	0.003	0.162	0.908	Silent corticotroph	Null Cell	SF-1
2	45	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	34	0.001	0	0	0.002	0	0.124	Gonadotroph	0.068	7,598	0	0.236	2,493	0.673	Gonadotroph	Null Cell	SF-1
3	32	Woman	No	Macroadenoma	Without	0.2	0.073	0.003	0.051	0.703	11,265	114,642	24,316	Silent corticotroph	8,174	0.029	0.113	0.219	1,844	1.262	Silent corticotroph	Null Cell	SF-1
4	34	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	3.147	0.004	0.002	0.002	1.073	0.001	0.014	0.014	Functioning somatotroph mixed	0.078	0.005	1.234	0.162	0.613	0.773	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
5	40	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	2.904	0.149	0.002	0	0	0.048	0.12	Gonadotroph	0.019	4.028	0.029	0.484	9,446	0.554	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
6	41	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	0.131	0.239	0	0	0	0.052	0.214	Gonadotroph	0.017	43,749	0.008	0.064	9,616	0.905	Gonadotroph	Null Cell	SF-1
7	63	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	4.998	0.012	0	0.002	0.004	0.186	0.1	Gonadotroph	0.034	2.406	0	0.019	0.236	0.855	Gonadotroph	Null Cell	SF-1
8	59	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0	0	0	0.435	62,939	0.232	Silent corticotroph	2.619	3.33	0	0	6,655	0.637	Silent plurihormonal unusual	Corticotroph	TPIT
9	30	Woman	No	Macroadenoma	Without	0.2	0.073	0.003	0.051	0.703	11,265	114,642	24,316	Silent corticotroph	9,852	0	0	0.002	1,668	1.66	Silent corticotroph	Corticotroph	TPIT
10	54	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	0.582	0.003	0.002	0.007	0.001	0.005	0.098	0	Functioning somatotroph	0.014	0	0.799	0.018	1,176	0.709	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
11	61	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.005	0.001	0	0	0	0.037	0.242	Null Cell	0.022	29,561	0	0.012	41,702	0.674	Gonadotroph	Gonadotroph	PTT
12	80	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0.029	0	0.001	0.056	0	0	Null Cell	0.047	17,496	0	0	22,959	0.309	Gonadotroph	Gonadotroph	PTT
13	58	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.007	4.348	0.101	0.001	0	0	0	0.066	Gonadotroph	0.01	2,376	0	0.539	9,294	0.179	Gonadotroph	Null Cell	SF-1
14	35	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0.001	0.647	0.001	0	0.002	0.001	0.058	0.066	Gonadotroph	0.01	13,865	0	0.466	2,857	0.474	Gonadotroph	Lactotroph	PTT
15	15	Man	Yes	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0	0.002	0	0	0	3.882	0.004	0.007	Functioning lactotroph	0.052	0	4.141	2.373	0.489	0.802	Functioning plurihormonal PTT	Lactotroph	PTT
16	40	Man	No	Macroadenoma	Hyperthyroidism	0.005	0.002	0	3.678	0	0	0	0.004	Functioning thyrotroph	0.032	0.014	1.149	0.001	0.211	0.418	Functioning plurihormonal PTT	Thyrotroph	PTT
17	42	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	0.665	12.77	0.036	0	17.31	0.001	0.286	20.854	Functioning plurihormonal unusual	0.164	0.315	0.856	4.518	0.382	0.727	Functioning plurihormonal PTT	Gonadotroph	SF-1
18	76	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	6.715	0.082	0	0	0	0.001	0.018	Null Cell	0.02	0.01	0.656	0.194	0.682	0.417	Functioning plurihormonal PTT	Gonadotroph	SF-1
19	59	Man	Yes	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0	0.001	0.05	0	0.001	0.007	0.018	0.018	Gonadotroph	0.015	0.791	0	1.005	3.99	0.568	Plurihormonal unusual	Plurihormonal unusual	SF-1
20	59	Man	No	Macroadenoma	Without	0	4.823	0.002	0	0	0	0.007	0.079	Gonadotroph	0.014	6.205	0.006	0.015	24.07	0.868	Gonadotroph	Plurihormonal unusual	PTT
21	76	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.288	0.006	0	0.002	0	0.007	0.079	Null Cell	0.04	0.014	2.19	0.162	0.184	0.99	Functioning plurihormonal unusual	Somatotroph	PTT
22	40	Woman	Yes	Microadenoma	Acromegaly	1.583	2.119	0.024	0.043	0.058	0.071	0.46	1.289	functioning plurihormonal unusual	0.222	0.117	0.117	0.162	0.184	0.99	Functioning plurihormonal unusual	Somatotroph	PTT
23	76	Man	No	Macroadenoma	Without	0	6.335	0.074	0	0	0	0.002	0.316	Gonadotroph	0.006	0.066	0	0.004	15,557	0.51	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
24	18	Man	Yes	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0.009	0.005	0.1	0	0.005	0.004	0.003	0.016	Null Cell	0.011	0.031	0.403	0.624	1.227	0.345	Gonadotroph	Null Cell	SF-1
25	43	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.443	0	0.001	0.002	0	0.154	0.135	Gonadotroph	0.017	2.43	0	0.295	0.073	0.31	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
26	53	Woman	No	Microadenoma	Acromegaly	0.777	0.216	0.029	0.017	0.262	0.073	0.001	0.01	Functioning somatotroph	0.109	0.04	0.381	0.133	0.465	0.507	Null Cell	Gonadotroph	SF-1
27	41	Woman	Yes	Macroadenoma	Cushing	0	0	0	0.002	0.001	12,853	53,269	42,451	Functioning corticotroph	9.166	0.006	0	0.001	0.319	0.683	Functioning corticotroph	Corticotroph	TPIT
28	31	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.007	0.002	0	0.139	1.036	0.232	0.74	0.395	Silent lactotroph	0.082	11.765	0.07	0.102	4.714	0.503	Gonadotroph	Null Cell	PTT-SF-1
29	59	Woman	No	Macroadenoma	Without	0.077	0.407	0.017	1.999	0.179	0.621	0.515	0.188	Silent thyrotroph	0.493	0.178	1.123	1.791	1.252	0.77	Functioning plurihormonal unusual	Somatotroph	PTT-SF-1
30	46	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	0.203	0	0	0.776	0.081	0	0.001	0	Functioning plurihormonal PTT	0.034	0.01	1.054	0.049	0.345	0.413	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT-SF-1
31	37	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	0.03	0	0.155	0	0	0.001	0.009	Null Cell	0.013	0.71	0.007	0.019	13,445	0.566	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1-TPIT
32	35	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	0.022	0	0.01	0	0	0.004	0.025	Null Cell	0.018	135.108	0.005	0.241	10,547	0.583	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
33	45	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.027	0.001	0.051	0.002	0	0.001	0.027	Null Cell	0.025	34,987	0.005	2,422	16,911	0.615	Gonadotroph	Null Cell	SF-1
34	69	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0.114	0	0.008	0	0	0	0.022	Null Cell	0.011	3.247	0	0.008	10,642	0.628	Gonadotroph	Null Cell	SF-1
35	58	Man	Yes	Microadenoma	Hyperprolactinemia	0	0	0	0.006	0.017	0	0.001	0.438	Silent corticotroph	0.141	0	3.104	0.403	1,911	0.731	Functioning plurihormonal PTT	Gonadotroph	SF-1
36	76	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	4.47	0.032	0.187	0	0	0.002	0.051	Gonadotroph	0.011	0	0.014	0.085	7,736	0.446	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
37	74	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.616	0.003	0.003	0	0	0.003	0.054	Gonadotroph	0.011	0.014	0.219	0	0.043	0.517	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
38	67	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.016	0.089	0.028	0.158	0.327	0.118	0.064	0.218	Silent lactotroph	0.118	0	0.06	0.233	43,249	0.88	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
39	47	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	3.304	0.023	0.002	0.092	0.21	0.104	0.09	0.296	Functioning somatotroph	0.137	0.266	0.938	0.076	0.815	0.69	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
40	69	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	2.477	0.005	0.017	0	0	0	0.076	Gonadotroph	0.015	1.983	0.001	0.164	11,343	0.567	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
41	49	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.365	0.136	0.002	0	0	0.002	0.065	Gonadotroph	0.015	22.13	0.003	0.12	2,056	0.563	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
42	63	Man	No	Macroadenoma	Without	0.84	1.982	1.779	0.024	5.224	0.534	0.127	0.326	Silent lactotroph	0.176	0.506	1.473	3.869	1,469	0.612	Silent plurihormonal PTT	Gonadotroph	SF-1
43	35	Woman	Yes	Microadenoma	Acromegaly	3.092	0.002	0.003	0.085	5.225	0.542	0.059	0.176	Functioning somatotroph mixed	0.135	0.059	1.782	0.517	1,634	0.615	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
44	19	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	0.719	0	0	0	0.039	0.266	0	0.001	Functioning somatotroph mixed	0.082	0.317	1.755	0.01	0.12	0.543	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
45	60	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	0.545	0.011	0.007	0	0	0.001	0.016	Gonadotroph	0.011	0.284	0	0.022	2,526	0.47	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1

Anexos

Case	Age (years)	Sex	CSI	Tumoral Size	Clinical phenotype	GH	FSH	LH	TSH	PRL	POMC	AVPR1b	CRHR1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific hormone genes	TBX19	NEUROD1	POU1F1	ESR1	GATA2	SF-1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific transcription factor genes	Subtypes based on IHC of pituitary-specific hormones	Subtypes based on IHC of pituitary-specific transcription factors
46	75	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0,022	0,318	0,007	1,15	0,236	0,538	0,145	1,372	Silent tyrotroph	0,206	0,333	0,032	0,091	12,647	0,584	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
47	51	Man	No	Macroadenoma	Without	0	1,555	0	0,115	0	0	0,006	0,016	Conoadotroph	0,074	36,624	0,441	33,766	0,544	Conoadotroph	Null Cell	Null Cell	
48	40	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0	0	0,604	0,169	0	0	0	Silent tyrotroph	0,092	0,037	2,04	0,013	1,308	0,381	Silent plurihormonal PTT	Tyrotroph	PTT
49	53	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,232	0,006	0,032	0	0	0,01	0,249	Conoadotroph	0,021	0	0,004	0,592	11,208	23,606	Gonadotroph	Gonadotroph	
50	50	Man	No	Macroadenoma	Without	0	4,645	0,004	0,004	0	0	0,103	0	Conoadotroph	0,018	0,241	0,001	0,069	7,902	0,633	Conoadotroph	Gonadotroph	
51	71	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,05	0,004	0,007	0	0	0,001	0,21	Null Cell	0,018	0	0	0,012	20,577	0,611	Conoadotroph	Corticotroph	TPIT
52	49	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0	0	0	0,001	4,529	0,148	Silent corticotroph	3,041	151,007	0	0,03	0,341	1,001	Silent corticotroph	Gonadotroph	SF-1
53	41	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,029	0	0	0	0	0,015	2,267	Null Cell	0,408	1,225	0,007	1,772	0,76	Conoadotroph	Conoadotroph	SF-1	
54	53	Woman	No	Microadenoma	Acromegaly	0,256	19,02	2,887	0	0,661	1,077	0,421	2,267	Functioning plurihormonal unusual	0,408	0	0,568	3,718	1,603	0,601	Functioning plurihormonal PTT	Gonadotroph	Null Cell
55	72	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,207	0	0,04	0	0,001	0,004	0,021	Conoadotroph	0,096	41,135	0	0,594	17,547	0,711	Conoadotroph	Gonadotroph	Null Cell
56	65	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,588	0,001	0,077	0,17	0,001	0,007	0,118	Conoadotroph	0,009	0,86	0,043	0,065	13,992	0,567	Conoadotroph	Gonadotroph	SF-1-PTT
57	63	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	1,281	0,478	0,207	0,475	0,186	0,315	0,032	0,279	Functioning somatotroph	0,153	0,225	1,28	0,338	0,628	0,564	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
58	75	Man	No	Macroadenoma	Without	0	5,216	0,001	1,044	0,001	0,013	0,005	0,025	Conoadotroph	0,021	4,672	0,02	0,361	0,331	0,672	Null Cell	Gonadotroph	SF-1
59	50	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,24	0,001	0,009	0	0	0,002	0,016	Conoadotroph	0,023	5,506	0,017	0,481	9,068	0,787	Conoadotroph	Gonadotroph	
60	44	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	0,043	0,002	0,023	0	0	0,001	0,091	Silent plurihormonal unusual	3,39	0,979	0,331	0,627	1,069	0,7	Silent plurihormonal unusual	Lactotroph	PTT
61	35	Woman	Yes	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0	0	0	0	0,001	15,76	0	0	Functioning lactotroph	0,348	0	3,948	4,984	0,395	1,039	Functioning plurihormonal PTT	Lactotroph	PTT
62	62	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,498	0,009	0,018	0	0	0	0,011	Conoadotroph	0,02	5,394	0,011	0,043	15,963	0,653	Conoadotroph	Gonadotroph	
63	21	Woman	No	Microadenoma	Hyperprolactinemia	0,324	0,077	0,055	0,006	5,091	0,012	0,018	0,054	Functioning mamosomatotroph	0,107	11,939	1,996	2,216	0,543	0,609	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
64	24	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	2,329	0,001	0	0,008	0	0,001	0,001	0,002	Functioning somatotroph	0,011	0,006	1,348	0,003	0,119	0,584	Functioning plurihormonal PTT	Gonadotroph	PTT
65	73	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,958	0,001	0,008	2,433	0	0,002	0,008	Null Cell	0,033	3,278	0	0,171	5,069	0,804	Conoadotroph	Gonadotroph	PTT-SF-1
66	51	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	0	0	0	0,006	0	0	0,002	0,008	Functioning somatotroph mixed	0,112	0	1,153	0,008	0,19	0,528	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
67	18	Man	No	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0	0	0	0,001	16,13	0	0,015	0	Functioning lactotroph	0,057	0	2,464	1,593	0,218	0,809	Functioning plurihormonal PTT	Lactotroph	PTT
68	54	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	0,983	0,001	0	0,283	0,006	0	0,001	0,002	Functioning somatotroph	0,061	0,003	1,075	0,005	0,095	0,663	Functioning plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
69	37	Man	No	Microadenoma	Without	0	0,616	0	0	10,93	0	0	0,005	Silent mamosomatotroph	0,345	0,013	2,057	3,355	0,135	0,783	Silent plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
70	52	Man	No	Macroadenoma	Without	0,222	0,179	0,11	0,052	1,579	0,137	0,404	0,733	Silent mamosomatotroph	0,26	0,256	1,201	1,524	2,493	0,819	Silent plurihormonal PTT	Somatotroph	PTT
71	83	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,586	0,001	0,107	0	0	0,005	0,01	Conoadotroph	0,016	4,737	0,002	0,13	12,411	0,86	Conoadotroph	Null Cell	PTT-SF-1
72	51	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0	0	0,003	0	1,611	14,685	1,095	Silent corticotroph	1,826	0,022	0	0,005	0,493	0,385	Silent corticotroph	Corticotroph	TPIT
73	32	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0	0	0,012	0	0	0,015	0,029	Null Cell	0,025	0	0,453	19,873	0,544	0	Conoadotroph	Gonadotroph	
74	38	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,062	0,006	0,008	0,001	0	0,001	0,171	Null Cell	0,025	8,609	0,005	0,01	10,605	0,498	Conoadotroph	Gonadotroph	
75	67	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,81	0,062	0,018	0	0	0	0,039	Conoadotroph	0,022	0,7	0,004	0,055	9,347	0,578	Conoadotroph	Null Cell	SF-1
76	41	Woman	No	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0	0	0	0,006	0	0	12,113	0,004	Silent corticotroph	6,64	20,516	0	0,01	0,131	0,374	Silent corticotroph	Gonadotroph	
77	43	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0,006	0	0	0,09	0,002	0	0,001	0,002	Null Cell	0,535	0	1,525	0,015	0,038	0,353	Silent plurihormonal PTT	Gonadotroph	
78	43	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,496	0	0	0	0	2,553	0	Conoadotroph	0	2,684	0,014	0	5,863	0,32	Conoadotroph	Gonadotroph	
79	60	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,103	0,019	0	0,001	0	0,938	0	Null Cell	0,929	1,324	0	0	5,168	0,174	Silent plurihormonal unusual	Gonadotroph	
80	49	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,101	0,034	0,209	0	0	4,498	0,084	Null Cell	0,021	1,103	0,021	0,01	3,665	0,4	Conoadotroph	Gonadotroph	
81	74	Man	No	Macroadenoma	Cushing	0	3,731	0,057	0,031	0	0	0,002	0,042	Conoadotroph	0,016	7,217	0,003	0,812	7,986	0,61	Conoadotroph	Null Cell	SF-1
82	56	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,018	0,018	0,001	0	0	0,004	0,007	Null Cell	0,015	2,145	0	0,006	4,9	0,554	Conoadotroph	Gonadotroph	SF-1
83	59	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	1,624	0,055	0,072	0	0	0,001	0,108	Conoadotroph	0,011	0	0,006	0,078	8,564	0,559	Conoadotroph	Gonadotroph	SF-1
84	42	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,026	0,006	0,004	0	0	0,001	0,006	Null Cell	0,023	0	0,007	0,018	5,032	0,296	Conoadotroph	Gonadotroph	
85	69	Woman	Yes	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0,001	0	0	0	0	0	0	0	Null Cell	0,371	0	0,304	0	21,209	0,311	Conoadotroph	Lactotroph	PTT
86	47	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0	0,016	0,001	0,347	4,963	0,026	Silent corticotroph	2,288	10,578	0,001	1,561	0,952	0,639	Silent corticotroph	Corticotroph	PTT
87	23	Man	No	Microadenoma	Cushing	0,001	0,853	0,358	0,117	0,01	0,007	11,747	3,483	Silent corticotroph	0,033	10,101	0,003	0,012	42,451	1,789	Conoadotroph	Gonadotroph	PTT
88	42	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	1,601	0,162	0,016	0	0	0,041	0	Conoadotroph	0,025	5,222	0,029	0,641	9,311	0,734	Conoadotroph	Gonadotroph	SF-1
89	65	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,262	0,239	0	0	0	0	0,038	Gonadotroph	0,063	0,665	0,002	0,019	6,602	0,938	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1
90	62	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0	0	0	0	0	0	Gonadotroph	0,063	0,665	0,002	0,019	6,602	0,938	Gonadotroph	Gonadotroph	SF-1

Case	Age (years)	Sex	CSI	Tumoral Size	Clinical phenotype	GH	FSH	LH	TSH	PRL	POMC	AVPR1b	CRHR1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific hormone genes	TBX19	NEUROD1	POU1F1	ESR1	GATA2	SF-1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific transcription factor genes	Subtypes based on IHC of pituitary-specific hormones	Subtypes based on IHC of pituitary-specific transcription factors
91	45	Woman	No	Macroadenoma	Cushing	0	0	0	0	0	0.001	27,396	3,296	19,928	8,187	0.325	0	0.001	0.073	0.756	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
92	55	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.051	0.014	0	0	0.014	23,097	0.336	0.36	1,912	7.069	0	0.002	0.138	0.599	Silent corticotroph	Silent corticotroph	
93	38	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0.006	0.023	0.143	0.024	0.288	0.119	0.159	0.564	0.54	0.028	7.466	0.06	0.444	13,509	0.662	Conoadotroph	Conoadotroph	
94	45	Woman	No	Macroadenoma	Cushing	0	0	0.026	0.02	8.066	4.234	20,512	0	0	4.713	0.012	0.002	0.006	0.215	0.717	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
95	72	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.007	0.001	0.147	0	0.001	0	0.046	0	0.135	0.275	0.971	0.136	17,656	0.916	Conoadotroph	Conoadotroph	
96	55	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	5.801	0.008	0.003	0	0	0.001	0.096	0	0	0.029	0	0.762	0.005	0.158	0.517	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
97	49	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	0.365	0.193	0.098	0.002	0.119	0.121	1.243	1.091	0	0.183	0.086	0.972	0.112	0.293	0.883	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
98	61	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.193	0	0	0	0	0	0.03	0	0.024	6.766	0	0.479	1.44	0.379	Null Cell	Null Cell	
99	70	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.773	0.083	0.003	0.001	0.015	0	0	0	0.013	1.906	0.004	0	46.518	0.398	Conoadotroph	Conoadotroph	
100	58	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.215	0.001	3.548	0	0.001	0	0.081	0	0.072	0.043	1.614	0.01	1.19	0.544	Silent tyrotroph	Silent tyrotroph	
101	16	Man	Yes	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0.003	0	0.003	0	4.95	0.001	0	0.493	0	0.075	0.061	0.726	1.489	0.707	0.407	Functioning lactotroph	Functioning plurihormonal PIT1	
102	37	Man	Yes	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0.001	0.003	0	0.114	4.829	0	0	0.012	0	0.128	0	2.144	2.802	1.217	1.042	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
103	70	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.014	0.009	0	0.051	1.388	0.473	Conoadotroph	Conoadotroph	
104	39	Woman	No	Microadenoma	Cushing	0.286	0.823	0.314	0.001	0.875	7.381	46,162	65,681	0	8.089	18.161	0.439	0.655	0.442	0.697	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
105	50	Woman	No	Macroadenoma	Without	0.102	0.296	0.095	0.011	1.892	5.059	91,359	64,759	0	7.994	0.365	0.407	0.853	0.377	0.675	Silent corticotroph	Silent corticotroph	
106	35	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.001	0.001	0	0	0	6.226	24,613	36,989	4.189	23.606	0.006	0.012	0.4	0.49	Silent corticotroph	Silent corticotroph	
107	55	Woman	Yes	Macroadenoma	Cushing	0	0	0.003	0	0	0.211	55,973	0	0	0.981	3.833	0	0.414	0.47	0.348	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
108	62	Man	Yes	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0.003	0.001	0	0.002	0.002	0.001	0.003	0.024	0	0.033	39.327	0.971	1.028	1.248	0.574	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
109	77	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0.799	0.099	0.037	0	0.02	0.008	0.092	0.089	0	0.032	14.222	0.755	0.047	0.312	0.847	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
110	17	Woman	Yes	Microadenoma	Without	0.26	0.424	0.25	0.228	0.019	2.998	6.004	15,491	0	1.735	5.889	0.496	0.51	5.299	0.717	Silent plurihormonal unusual	Silent plurihormonal unusual	
111	38	Woman	No	Microadenoma	Cushing	0	0.001	0.002	0	0.087	2.694	18,494	36,641	0	19.492	0.251	0.023	0.044	0.152	0.766	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
112	33	Woman	No	Macroadenoma	Cushing	0.005	0.011	0.008	0	0.035	11.569	36.91	62,216	0	7.319	0	0.016	0.023	0.803	0.673	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
113	41	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.255	0.002	0	0	0	0	0.484	0	0.049	2.24	0	1.296	23.639	0.824	Conoadotroph	Conoadotroph	
114	39	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0.014	0.021	0.034	0	0.015	0.003	0.027	0.163	0	0.032	3.595	0.457	0.494	12.69	0.98	Conoadotroph	Conoadotroph	
115	68	Woman	No	Macroadenoma	Cushing	0	0	0.001	0	0	1.017	19,798	1,575	0	2.208	7.385	0	0.016	0.334	0.461	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
116	42	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.05	0.061	0	0.013	0	0	0	0	0.106	13.194	0.011	0.027	2.567	2.387	Conoadotroph	Conoadotroph	
117	28	Woman	No	Microadenoma	Cushing	0	0.001	0.001	0	0	1.888	47,589	20,139	0	7.984	0.002	0.001	0.004	0.985	1.266	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
118	39	Woman	No	Microadenoma	Cushing	0.002	0.005	0.003	0	0.023	5.534	38,274	53,348	0	7.62	0.031	0.018	0.029	0.344	1.297	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
119	75	Man	No	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0.001	0.001	0	0.009	24.46	0.02	0.024	0.25	0	0.286	0.022	0.022	3.153	5.677	1.445	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
120	32	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0.001	0	0.001	6.839	109,186	57,496	0	11.322	0.828	0.001	0.013	1.112	1.331	Silent corticotroph	Silent corticotroph	
121	48	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	2.653	0.004	0.002	0.012	0.001	0	0	0	0	0.174	0	2.306	0.009	0.444	1.465	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
122	39	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0.033	0	0.001	0.002	0.002	0	0	0	0	0.031	0	3.377	0.002	0.19	1.145	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
123	31	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.006	0.003	0.001	0	2.269	5.053	6,141	0	0.335	0.033	0.001	0.038	1.776	1.096	Conoadotroph	Conoadotroph	
124	37	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	2.61	0.001	0.003	0	0.011	0.001	0	0.024	0	0.053	0.003	4.396	0.006	0.175	1.411	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
125	22	Woman	No	Microadenoma	Cushing	0.168	0.106	0.063	0.029	0.496	4.869	59,396	37,842	0	7.974	0.479	0.648	0.611	1.06	0.959	Functioning corticotroph	Functioning corticotroph	
126	22	Woman	Yes	Macroadenoma	Hyperthyroidism	0.019	0	0	0.734	0	0.001	0.001	0.002	0	0.2	0	2.411	0.023	0.13	0.747	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
127	68	Woman	No	Macroadenoma	Without	0.009	0.298	0.023	1.284	0.001	0.026	0.322	0.815	0	0.107	9.116	5.659	0.052	4.394	0.951	Silent plurihormonal PIT1	Silent plurihormonal PIT1	
128	52	Woman	No	Microadenoma	Acromegaly	0.642	0.01	0.003	0.001	0.017	0.004	0.065	0.15	0	0.047	0.052	2.125	0.284	0.561	1.473	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
129	54	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.024	0.148	0.001	0	0	0	0.029	0.069	0	0.028	4.918	0.042	0.015	88.503	1.221	Conoadotroph	Conoadotroph	
130	56	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	3.844	0.013	0.002	0.019	0.178	0.003	0.058	0.067	0	0.131	0.011	3.389	0.083	0.706	1.293	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
131	29	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	1.997	0.002	0.001	0	0.024	0.012	0.107	0.142	0	0.047	0.081	2.964	0.037	0.588	1.504	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
132	58	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0.009	0.198	0.001	0.007	0.052	0.01	0.126	0.627	0	0.043	7.699	0.047	0.329	35.92	1.227	Conoadotroph	Conoadotroph	
133	36	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0.027	0.001	0.002	2.613	0.027	0.033	0.161	0.57	0	0.254	0.011	3.489	0.033	0.495	1.119	Silent plurihormonal PIT1	Silent plurihormonal PIT1	
134	55	Man	No	Microadenoma	Acromegaly	2.012	0.007	0.008	0.005	0.037	0.199	0.767	2.687	0	0.35	0.293	4.008	0.033	0.377	1.605	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	
135	57	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	1.22	0.031	0.005	0	0.004	0.004	0.081	0.128	0	0.038	0.149	3.767	0.234	2.269	1.754	Functioning plurihormonal PIT1	Functioning plurihormonal PIT1	

Anexos

Case	Age (years)	Sex	CSI	Tumoral Size	Clinical phenotype	GH	FSH	LH	TSH	PRL	POMC	AVPR1b	CRHR1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific hormone genes	TBX19	NEUROD1	POU1F1	ESR1	GATA2	SF-1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific transcription factor genes	Subtypes based on IHC of pituitary-specific hormones	Subtypes based on IHC of pituitary-specific transcription factors
136	40	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	0.698	0.006	0.001	0.001	2.801	0.005	0.039	0.133	Functioning macromatotroph	0.274	0.094	3.931	4.538	1.331	1.119	Functioning plurihormonal PTT1		
137	35	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	3.822	0.004	0.011	0	0.041	0.001	0	0	Functioning somatotroph	0.015	0.015	2.399	0.004	0.225	0.859	Functioning plurihormonal PTT1		
138	49	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.371	0.103	0	0	0	0	0.013	Conoadotroph	0.019	5.035	0.002	0.178	17.227	1.255	Conoadotroph		
139	58	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0.004	0.043	0.06	0.044	0	0.003	0.736	1.881	Null Cell	0	4.336	0.118	0	11.247	1.509	Conoadotroph		
140	36	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	1.537	0.001	0	0	0	0.331	0.168	Conoadotroph	4.909	264.618	0.002	0.029	0.335	1.866	Silent plurihormonal unusual		
141	71	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0.044	0.369	0.045	0.004	0.004	0.023	0.7	1.183	Conoadotroph	0.073	0	0.033	0	22.126	1.043	Conoadotroph		
142	57	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.004	0.001	0	0	0.005	95.778	0.096	Silent corticotroph	0.061	7.306	3.606	0.089	0.421	1.297	Silent plurihormonal PTT1		
143	53	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.062	0.034	0.04	0.005	0.004	0.048	0.497	0.998	Null Cell	0.108	31.082	0.279	19.749	0.745	1.297	Conoadotroph		
144	33	Woman	No	Macroadenoma	Without	0.002	0.002	0.001	0	0	0.015	65.446	0.138	Silent corticotroph	0.033	8.397	0.211	0.063	6.64	0.775	Conoadotroph		
145	71	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.349	0.004	0.002	0.001	0.027	0.126	0.811	1.531	Functioning somatotroph	0.119	0.065	1.102	0.101	0.735	0.776	Functioning plurihormonal PTT1		
146	41	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0	0.216	0	0	0	0	0.004	0.154	Conoadotroph	0	2.631	0	0	0	22.574	Conoadotroph		
147	35	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0	0	0	0	0.004	0.154	Conoadotroph	0	2.631	0	0	0	22.574	Conoadotroph		
148	35	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	2.073	0.004	0.002	0.003	0	0	0.024	0.012	Functioning somatotroph	0.016	0.018	2.376	0.005	0.149	0.637	Functioning plurihormonal PTT1		
149	52	Woman	No	Macroadenoma	Cushing	0.001	0.001	0	0	0	1.276	10.153	16.165	Functioning corticotroph	2.734	0.045	0.002	0.068	0.156	0.669	Functioning corticotroph		
150	25	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0.227	0.001	0.006	0.001	0	0	0.025	0.005	Functioning somatotroph	0.051	1.237	1.976	0.003	0.543	1.477	Functioning plurihormonal PTT1		
151	75	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.033	0.001	0	0	0	0.038	0.099	Null Cell	0.033	1.361	0	0.013	15.054	1.014	Conoadotroph		
152	56	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0.282	0.038	0	0	0	0.003	0.244	Conoadotroph	0.018	5.576	0.094	0.031	18.083	0.739	Conoadotroph		
153	54	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	10.98	0.009	0	0	0	0.202	0.65	Conoadotroph	0.018	2.214	0	0.889	0.198	0.525	Null Cell		
154	37	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0.179	0.003	0	0.017	0.006	0.003	0.005	0.011	Functioning somatotroph	0.041	23.785	1.631	0.015	0.088	0.795	Functioning plurihormonal PTT1		
155	29	Woman	Yes	Macroadenoma	Hyperprolactinemia	0	0	0	0	0	0.315	0	6.228	Silent corticotroph	0.477	46.677	1.88	0	0	1.669	Silent plurihormonal unusual		
156	44	Woman	No	Macroadenoma	Cushing	0	0.002	0	0	0	0.036	21.887	0.826	Functioning corticotroph	3.155	202.99	0	0	0	0.576	Functioning corticotroph		
157	34	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	2.284	0.019	0.071	0.004	0.18	0.031	0.029	0.08	Functioning somatotroph	0.192	2.276	3.567	0.239	0.225	0.725	Functioning plurihormonal PTT1		
158	70	Woman	No	Macroadenoma	Without	0.001	0	0	0.002	3.146	0	0.001	0.22	Silent lactotroph	0.05	1.037	2.428	0.146	0.72	0.518	Silent plurihormonal PTT1		
159	37	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.062	1.048	0.001	0.032	2.749	0.004	0.003	0.04	Silent plurihormonal unusual	0.059	1.69	0.061	0.242	1.52	0.428	Conoadotroph		
160	53	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	0.055	0	0	0.004	131.5	0	0	0.001	Silent lactotroph	0.592	0.122	2.794	0.714	0.188	0.862	Functioning plurihormonal PTT1		
161	49	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.001	0	0.001	0.029	2.794	0.123	0.277	0.214	Silent lactotroph	1.046	3.231	0.011	0.612	0.344	0.191	Silent corticotroph		
162	21	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0.629	0	0.001	0.102	0.165	0.001	0.001	0.002	Functioning somatotroph	0.038	1.878	2.116	0	0	0.34	Functioning plurihormonal PTT1		
163	50	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.001	20.54	0.161	0.01	0.006	0	0.001	0.052	Conoadotroph	0.014	0.748	0.001	0.28	5.339	0.633	Conoadotroph		
164	36	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	35.75	0.019	0.016	0.01	2.925	0.001	0	0	Functioning somatotroph mixed	0.014	5.177	0.013	0	0	0.019	Null Cell		
165	56	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.006	19.39	1.67	15.15	0.685	0	0	0.13	Silent plurihormonal unusual	0	6.377	0	0.024	0.113	0.012	Null Cell		
166	48	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0.01	2.433	4.049	2.266	2.476	0	0.001	0.021	Silent plurihormonal unusual	0.012	2.724	0.574	0.054	2.494	0.367	Silent plurihormonal unusual		
167	68	Woman	No	Macroadenoma	Cushing	0	0.002	0	0.003	0	11.722	24.512	69.236	Functioning corticotroph	8.508	0.907	0.003	0	0.046	1.431	Functioning corticotroph		
168	69	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	0.191	0.249	0.005	0.009	0.232	0.073	0.101	0.68	Functioning somatotroph	0.025	2.351	0.581	0.08	0	0.253	Functioning plurihormonal PTT1		
169	66	Man	No	Macroadenoma	Hyperthyroidism	0.052	0.205	0.001	19.39	0.024	0.002	0.003	0.013	Functioning tyrotroph	0.049	1.494	1.778	0.918	0.041	0.646	Functioning plurihormonal PTT1		
170	41	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0.174	0	0.005	0.059	0.009	0.009	0.003	0.019	Functioning somatotroph	0.066	7.548	2.154	0.036	0.1	0.667	Functioning plurihormonal PTT1		
171	57	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	9.89	0.001	1.033	0	0.001	0.004	0.102	Conoadotroph	0.041	11.323	0.003	0.114	10.567	1.476	Conoadotroph		
172	32	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	1.777	0.001	0.001	0.059	1.632	0.005	0.004	0.093	Functioning somatotroph mixed	0.03	0.812	3.812	0.289	0.06	0.735	Functioning plurihormonal PTT1		
173	66	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.022	0.194	0	5.318	0.02	0.02	0.03	0.29	Silent tyrotroph	0.085	1.024	1.797	0.08	0.207	0.643	Silent plurihormonal PTT1		
174	62	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	1.339	0	0.003	0	0	0.003	0.039	Conoadotroph	0.039	9.029	0	0.425	0.577	0.893	Conoadotroph		
175	44	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0.242	0.361	0.019	0.188	0.244	0.012	0.005	0.088	Silent plurihormonal unusual	0.043	18.128	0.05	0.214	15.57	1.05	Conoadotroph		
176	44	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	37.35	0.014	0.085	15.39	24714	0.001	0.001	0.019	Functioning plurihormonal PTT1	0.179	0.021	2.476	0.06	0.175	0.605	Functioning plurihormonal PTT1		
177	39	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	1.169	0.003	0.001	0	0.033	0.046	0	0.113	Functioning somatotroph	0.042	0.363	1.154	0	0.542	0.898	Functioning plurihormonal PTT1		
178	39	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0.001	3.503	0.02	3.501	0.858	0.192	0	1.641	Silent plurihormonal unusual	0.044	5.205	0.053	0.069	5.924	0.791	Conoadotroph		
179	28	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	1.459	0	4.964	0.001	0	0	2.255	Silent plurihormonal unusual	0.034	12.988	0.001	1.245	1.776	0.661	Conoadotroph		
180	67	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0.109	0.001	0	3.198	1.921	0.001	0.001	1.58	Functioning plurihormonal PTT1	0.221	1.303	6.073	0	0.056	0.919	Functioning plurihormonal PTT1		

Case	Age (years)	Sex	CSI	Tumoral Size	Clinical phenotype	GH	FSH	LH	TSH	PRL	POMC	AVPR1b	CRHR1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific hormone genes	TBX19	NEUROD1	POU1F1	ESR1	GATA2	SF-1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific transcription factor genes	Subtypes based on IHC of pituitary-specific hormones	Subtypes based on IHC of pituitary-specific transcription factors
181	36	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,001	0	0,04	0	0	0	0,012	Null Cell	0,012	35,863	0	0,43	1,334	0,573	Conadotroph		
182	40	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0,65	0,019	0,005	0,01	0,156	0,433	0	2,18	Functioning somatotroph	0,081	0,27	3,541	0,177	0,456	0,62	Functioning plurihormonal PIT1		
183	43	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0,831	0,001	0	0,007	1,598	0	0	0	Functioning somatotroph mixed	0,308	0,032	4,613	0,496	0,069	1,112	Functioning plurihormonal PIT1		
184	70	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,553	0,105	0	0	0,102	0,125	0	Conadotroph	0,189	12,504	0	0,64	28,119	0,988	Conadotroph		
185	56	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0,534	0,002	0,001	0,001	0	0,001	0	0,039	Functioning somatotroph	0,021	0,031	1,585	0,018	0,241	1,099	Functioning plurihormonal PIT1		
186	69	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	0	0,001	0	0,004	3,639	67,419	72,3	Silent corticotroph	10,335	0,014	0,003	0,009	1,492	1,811	Silent corticotroph		
187	63	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0,001	0	0	3,955	128,072	11,9	Silent corticotroph	12,469	0,57	0	0	1,791	1,612	Corticotroph		
188	58	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,221	0,008	0,001	0,012	0,021	0,158	0,316	Conadotroph	0,06	5,516	0,044	0,045	8,441	1,043	Conadotroph		
189	55	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,889	0,008	0	0	0	0	0	Null Cell	0,078	8,176	0,003	0,147	4,842	1,047	Conadotroph		
190	44	Man	No	Microadenoma	Cushing	0,001	0,827	0,069	0	0,097	0,066	0,578	0,7	Conadotroph	0,147	4,054	0,082	0,091	42,415	1,091	Conadotroph		
191	36	Woman	No	Macroadenoma	Cushing	0	0	0,001	0	0	0,833	52,536	23,915	Functioning corticotroph	42,928	0,282	0	0,003	1,702	1,057	Functioning corticotroph		
192	62	Man	No	Macroadenoma	Without	0,011	0,769	0,232	0,001	0,001	0,001	1,406	0,083	Conadotroph	0,126	3,286	0,007	0,498	0,465	0,946	Conadotroph		
193	51	Woman	No	Macroadenoma	Without	0,001	0,033	0,001	0,448	0	0,001	0,108	0,024	Silent tyrotroph	0,124	0,129	2,149	0,371	1,579	0,956	Silent plurihormonal PIT1		
194	42	Woman	No	Macroadenoma	Without	4,271	0,032	0,001	0,223	0,049	0,012	0,237	0,124	Silent somatotroph	0,45	0,096	2,229	0,09	0,174	0,858	Silent plurihormonal PIT1		
195	51	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	0,476	0	0	0,024	0,007	0	0	0	Functioning somatotroph	0,021	0,011	1,219	0,011	0,312	0,732	Functioning plurihormonal PIT1		
196	27	Woman	No	Macroadenoma	Without	0,001	0	0,001	0	0,002	7,411	21,61	15,951	Silent corticotroph	6,683	0,029	0,002	0,012	1,824	0,795	Silent corticotroph		
197	27	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	2,35	0	0,001	0,001	0,005	0,002	0,022	0,003	Functioning somatotroph	0,048	0,039	1,288	0,002	0,174	0,947	Functioning plurihormonal PIT1		
198	51	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,19	0,105	0,001	0,001	0	0	0,12	Null Cell	0,032	9,676	0,001	0,012	5,316	1,126	Conadotroph		
199	78	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,064	0,004	0,004	0	0	0,01	0,31	Null Cell	0,145	14,415	0,062	0,104	11,764	1,313	Conadotroph		
200	65	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0,001	0,044	0,02	1,755	0,002	0,003	0	0	Silent tyrotroph	0,026	9,213	0	0	0	0	Null Cell		
201	77	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	3,769	0,023	0,045	0,004	0	0	0	Conadotroph	0,028	2,901	0,01	0,122	4,1	0,252	Conadotroph		
202	54	Woman	No	Microadenoma	Cushing	0,001	0,004	0,001	0,002	0,015	0,227	0,288	1,192	Functioning somatotroph	0,876	0,144	0,004	0,042	0,335	1,558	Functioning plurihormonal PIT1		
203	32	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	3,624	0	0,004	0,004	0,026	0	0	0,002	Functioning somatotroph	0,042	0,005	2,155	0,012	1,674	0,88	Functioning plurihormonal PIT1		
204	58	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0,007	2,261	0,032	0,027	0,002	0	0,01	0,071	Conadotroph	0,021	0,517	0,005	0,131	9,966	0,884	Conadotroph		
205	63	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	1,603	0	0,012	0	0	0,001	0,012	Conadotroph	0,123	0,465	0,002	0,495	3,63	1,636	Conadotroph		
206	68	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	4,379	0,001	0,006	0,071	0,07	0	0,001	0,003	Functioning somatotroph	0,034	0,205	2,222	0,047	0,4	1,5	Silent plurihormonal unusual		
207	62	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,186	0	0,013	0	0	0,001	0,008	Conadotroph	0,038	5,85	0	0,256	6,5	0,925	Conadotroph		
208	54	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	0,274	0	0	0,105	0,017	0	0,001	0,002	Functioning somatotroph	0,042	0,019	1,995	0,012	0,12	1,444	Silent plurihormonal unusual		
209	68	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	0,231	0,001	0,006	0,033	0,001	0,002	0,283	Conadotroph	0,029	3,145	0,006	0,048	7,302	0,771	Conadotroph		
210	40	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,536	0,004	0,023	0,001	0	0	0,03	Conadotroph	0,032	5,174	0,002	0,08	4,996	1,041	Conadotroph		
211	50	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,689	0,001	0,024	0	0	0,055	0,468	Conadotroph	0,027	1,774	0,016	0,02	22,633	1,493	Conadotroph		
212	43	Woman	No	Microadenoma	Acromegaly	3,225	32,64	0,038	0	7,269	0,003	1,792	68,344	functioning plurihormonal unusual	0,097	0,013	2,288	2,133	0,404	1,24	Functioning plurihormonal PIT1		
213	48	Man	No	Macroadenoma	Without	0	2,467	0,023	0,006	0,001	0,006	0,156	0,321	Conadotroph	0,045	3,013	0,003	1,122	5,643	1,122	Conadotroph		
214	74	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,158	0,035	0	0	0	0	0,429	Conadotroph	0,018	3,075	0,011	0,011	29,366	1,163	Conadotroph		
215	68	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,536	0,008	0,003	0,028	0,013	0,221	0,251	Conadotroph	0,043	2,396	0,203	0,259	24,891	1,441	Conadotroph		
216	53	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	0,003	0,004	0	0	0,011	110,608	0,158	Silent corticotroph	3,114	7,191	0	0,006	0,749	0,724	Silent corticotroph		
217	58	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	1,921	0	0,002	0,011	0,018	0	0	0	Functioning somatotroph	0,288	0,011	3,736	0,004	0,18	1,312	Functioning plurihormonal PIT1		
218	42	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,975	0,006	0	0	0,004	0,117	0,117	Conadotroph	0,02	7,926	0	0	3,178	1,388	Conadotroph		
219	54	Man	No	Macroadenoma	Cushing	0,001	0,002	0,003	0	0,003	5,94	67,981	42,566	Functioning corticotroph	4,947	0,005	0,002	0,01	0,197	1,984	Functioning corticotroph		
220	63	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0,001	0	0	0	0,721	0,746	Null Cell	0,017	0,018	0,001	0,043	2,742	0,573	Conadotroph		
221	46	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,054	0,044	0	0	0	0,049	0,294	Conadotroph	0,025	2,279	0	0,011	25,309	1,386	Conadotroph		
222	65	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	8,441	0	0	0	0	0,191	0,036	Conadotroph	1,162	0,064	0	7,702	0,639	3,996	Silent plurihormonal unusual		
223	42	Man	No	Macroadenoma	Without	0,011	0,001	0,001	0,001	0,053	0,001	0,002	0,012	Silent lactotroph	0,03	0,005	2,002	0,003	0,07	0,712	Silent plurihormonal PIT1		
224	43	Man	Yes	Macroadenoma	Cushing	0	0	0,001	0	0	1,579	18,032	10,21	Functioning corticotroph	5,997	8,875	0	0,019	0,243	1,016	Functioning corticotroph		
225	45	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0	0	0	0	0	0	0,003	Null Cell	0,016	0,08	0	0,034	1,589	0,894	Conadotroph		

Anexos

Case	Age (years)	Sex	CSI	Tumoral Size	Clinical phenotype	GH	FSH	LH	TSH	PRL	POMC	AVPR1b	CRHR1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific hormone genes	TBX19	NEUROD1	POU1F1	ESR1	GATA2	SF-1	Subtypes based on RT-qPCR of pituitary-specific transcription factor genes	Subtypes based on IHC of pituitary-specific hormones	Subtypes based on IHC of pituitary-specific transcription factors
226	37	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	0,134	0	0,001	0	0,006	0,002	0,017	0,057	Functioning somatotroph	0,036	0,186	2,979	0,037	0,991	1,117	Functioning plurihormonal PTT		
227	42	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0,001	0	0,001	2,299	0	0,001	1,912	0,046	Silent tyrotroph	3,692	30,288	0	0,002	0,017	0,571	Silent corticotroph		
228	39	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	2,227	0	0	0,006	0	0	0,003	0	Functioning somatotroph	0,069	0,186	5,386	0,02	0,187	1,73	Functioning plurihormonal PTT		
229	66	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,017	0,01	0,004	0	0	0,001	0,03	Null Cell	0,028	5,059	0,006	0,005	17,676	0,753	Conadotroph		
230	47	Man	No	Macroadenoma	Acromegaly	0,04	0,022	0,01	2,297	0,061	0,018	0,034	0,397	Silent tyrotroph	0,099	6,063	0,029	0,028	10,828	1,387	Conadotroph		
231	60	Man	No	Macroadenoma	Without	0,003	1,882	0,226	0,015	0,938	0,031	0,02	0,123	Conadotroph	0,073	6,451	0,058	0,278	1,217	0,926	Conadotroph		
232	32	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	0,027	0,049	0,062	1,76	2,381	0,198	0,164	0,239	Silent plurihormonal PTT	0,475	1,337	1,117	0,369	2,48	1,069	Functioning plurihormonal PTT		
233	47	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,119	0,003	0,026	0,007	0,002	0,006	0,218	Conadotroph	0,029	9,78	0,003	0,891	3,209	1,214	Conadotroph		
234	84	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	6,24	0,002	0,044	0,001	0,001	0,003	0,045	Conadotroph	0,037	5,207	0,025	0,918	4,524	0,526	Conadotroph		
235	70	Man	No	Macroadenoma	Without	0	2,198	0,049	0,004	0,006	0,005	0,01	0,166	Conadotroph	0,054	0,481	0,2	0,277	13,086	0,77	Conadotroph		
236	47	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0,197	0,006	0	0,153	0,112	0,022	0,016	0,044	Functioning somatotroph	0,033	0,112	1,026	0,021	0,027	0,521	Functioning plurihormonal PTT		
237	37	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	1,934	0,698	0,012	0,001	0	0	0,062	Conadotroph	0,026	3,745	0	0,17	3,736	0,845	Conadotroph		
238	68	Man	Yes	Macroadenoma	Without	1,608	0,006	0,003	0,01	5,603	0,075	0,034	0,589	Silent somatotroph mixed	0,134	0,102	2,178	0,401	0,076	1,148	Silent plurihormonal PTT		
239	51	Woman	No	Macroadenoma	Acromegaly	0,044	0	0	1,203	0,355	0	0	0,417	Conadotroph	0,068	1,101	0,026	0,825	9,822	1,02	Conadotroph		
240	62	Woman	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	0,044	0	0	0	0	0	0	0,002	Functioning plurihormonal PTT	0,194	0,106	1,745	0,119	0,109	1,485	Functioning plurihormonal PTT		
241	35	Man	Yes	Macroadenoma	Acromegaly	1,591	0,006	0,001	0,004	0,048	0,351	0,705	3,423	Functioning plurihormonal unusual	3,485	1,311	2,79	0,277	0,486	1,991	Functioning plurihormonal unusual		
242	51	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,383	0,061	0,092	0,014	0,008	0,016	0,159	Conadotroph	0,056	11,656	0,023	0,119	4,719	1,167	Conadotroph		
243	40	Woman	No	Macroadenoma	Cushing	0	0,001	0,001	0	0	1,067	1,258	3,366	Functioning corticotroph	8,548	68,828	0,002	0,069	0,056	1,061	Functioning corticotroph		
244	55	Man	No	Macroadenoma	Without	0	0,076	0	0,014	0	0	0,002	0,019	Null Cell	0,026	5,215	0	0,244	11,783	0,791	Conadotroph		
245	38	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,304	0	0	0,001	0	0,001	0,01	Conadotroph	0,03	6,304	0,184	1,526	2,282	0,881	Conadotroph		
246	36	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0	0	0	0,011	12,483	4,9	38,751	Silent corticotroph	12,376	0,086	0,002	0,014	0,25	1,416	Silent corticotroph		
247	17	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,001	0	0	0	0,24	1,482	0,002	Silent corticotroph	3,177	3,016	0	0,138	1,512	1,238	Silent corticotroph		
248	62	Woman	No	Macroadenoma	Without	0	0	0	0	0	0,001	0,083	0,003	Null Cell	1,479	7,448	0	0,02	3,879	0,779	Silent plurihormonal unusual		
249	55	Man	No	Macroadenoma	Without	0,001	0,495	0,024	0,016	0,012	0,005	0,003	0,241	Conadotroph	0,026	23,351	0,017	0,149	10,866	0,881	Conadotroph		
250	43	Woman	Yes	Macroadenoma	Without	0,001	0,002	0	0,009	0,06	0,002	37,02	0,213	Silent corticotroph	3,236	12,843	0,02	0,057	0,128	0,846	Silent corticotroph		
251	58	Man	Yes	Macroadenoma	Without	0	0,001	0,005	0,018	0	0,001	0,043	0,065	Null Cell	0,096	0,048	0,001	0,428	4,062	0,815	Conadotroph		

IHC, immunohistochemistry; CSI: Cavernous sinus invasion; Intense colors: > p25 Fold Change values; Light colors: < p25 Fold Change values.

ANEXO II

Tabla Suplementaria Artículo 2

Case	Invasiveness	Sex	Age (years)	MTD	Extension	kit67 IHC	IHC subtype	Clinical subtype	Biochemistry				Fold Change														
									PRL	GH	IGF1	Cortisol	ACTH	UFC	TSH	FT4	Molecular subtype	GH	FSH	LH	TSH	PRL	POMC	AVPR1B	CRHR1		
1	Non invasive	Female	34	18	intrascalar	0.6	ST MIXED	Acromegaly	38.7	15.8	1406									3.147	0.004	0	0.002	1.073	0.001	0.014	0.021
2	Non invasive	Female	54	22	intrascalar	2.1	ST	Acromegaly	19.9	1130										0.582	0.003	0	0.007	0.001	0.005	0.098	0
3	Non invasive	Male	42	13	intrascalar	1.5	ST MIXED	Acromegaly	32.1	8	524									0.665	12.77	0.04	0	17.311	0.001	0.286	20.854
4	Invasive	Male	40	35	Invasive	0.5	ST MIXED	Acromegaly												0.471	16.01	0.27	0	0.874	0.963	2.131	21.199
5	Invasive	Female	53	17	Invasive	0.8	ST	Acromegaly	55.6	850										0.132	1.198	0.01	0.003	0.365	1.34	4.745	1.375
6	Invasive	Female	40	22	Invasive	2.5	ST	Acromegaly		334										1.583	2.119	0.02	0.043	0.058	0.071	0.46	1.289
7	Non invasive	Female	59	13	intrascalar	2.2	ST	Acromegaly	17	11.9	513									0.077	0.407	0.02	1.999	0.179	0.621	0.515	0.188
8	Non invasive	Female	46	10		1	ST MIXED	Acromegaly												0.203	0	0.776	0	0.081	0	0.001	0
9	Invasive	Female	47	15	intrascalar	0.3	ST	Acromegaly	39.8	1084.6										3.304	0.023	0	0.092	0.21	0.104	0.09	0.296
10	Non invasive	Female	35	5	intrascalar	1.5	ST MIXED	Acromegaly	26.4	3.89	594									3.092	0.002	0	0.085	5.225	0.542	0.059	0.176
11	Non invasive	Male	19	21	extrascalar	5	ST	Acromegaly	21.9	991										0.719	0	0	0.039	0.266	0	0	0.001
12	Non invasive	Female	63	12	intrascalar	0.2	ST	Acromegaly	7.2	368										1.281	0.478	0.21	0.475	0.186	0.315	0.032	0.279
13	Invasive	Female	24	40	Invasive	2.2	ST	Acromegaly	31	38	818									2.329	0.001	0	0.008	0	0.001	0.001	0.002
14	Non invasive	Female	51	18	extrascalar	2.5	ST MIXED	Acromegaly												0.958	0.001	0	0.008	2.433	0	0.002	0.008
15	Non invasive	Male	54	15		<1	ST	Acromegaly	18.6	743										0.983	0.001	0	0.283	0.006	0	0.001	0.002
16	Invasive	Male	55	25	Invasive	0	ST MIXED	Acromegaly	11.8	94.7	1035									5.801	0.008	0	0	0	0.001	0.096	0
17	Non invasive	Female	49	10	intrascalar	ST		Acromegaly	1.71	382										0.565	0.153	0.06	0.002	0.119	0.121	1.243	1.091
18	Non invasive	Male	32	11	intrascalar	ST		Acromegaly	3.42	1458										1.132	0.038	0.02	0.001	0.963	0.02	0.132	0.157
19	Non invasive	Female	50	13	intrascalar	0	ST MIXED	Acromegaly	10.5	1060										3.833	0.12	0.01	0.01	0.048	0.026	0.194	0.338
20	Non invasive	Female	50	5	intrascalar	0	ST MIXED	Acromegaly	6.4	0.88	733									3.025	0.855	0.19	0.015	0.344	0.083	0.091	0.149
21	Invasive	Female	77	14	Invasive	<1	NULL	Acromegaly												0.799	0.099	0.04	0	0.02	0.008	0.092	0.089
22	Non invasive	Male	33	14	intrascalar	1	ST MIXED	Acromegaly	17	7.57	1295									0.402	0.026	0	0.002	0.037	0.013	0.279	0.477
23	Non invasive	Male	45	13	intrascalar	<1	NULL	Acromegaly												1.453	0.014	0	0.015	0.001	0	0	0
24	Invasive	Male	42	12	intrascalar	<1	ST MIXED	Acromegaly	14.6	58.6	2363									1.805	0.012	0	0.001	0.422	0.051	0.289	0.604
25	Non invasive	Male	34	10	intrascalar	2	ST MIXED	Acromegaly	8.9	9.58	1110									2.918	0	0.01	0	0.018	0.008	0.069	0.14
26	Invasive	Male	39	29	extrascalar	2	ST MIXED	Acromegaly	2081	1.48	632									0.014	0.021	0.03	0	0.015	0.003	0.027	0.163
27	Non invasive	Male	48	8	intrascalar	1	ST MIXED	Acromegaly	8.8	11.1	1045									2.653	0.004	0	0.012	0.001	0	0	0
28	Invasive	Female	39		extrascalar	5	ST MIXED	Acromegaly												0.033	0	0	0.002	0.002	0	0	0
29	Invasive	Male	37	15	extrascalar	0	ST	Acromegaly	80.6	694										2.61	0.001	0	0	0.011	0.001	0	0.024
30	Non invasive	Female	52	10	intrascalar	1	ST	Acromegaly	1.7	703										0.642	0.01	0	0.001	0.017	0.004	0.065	0.15
31	Invasive	Male	56	9	intrascalar	<1	ST MIXED	Acromegaly	14.1	14.6	841									3.844	0.013	0	0.019	0.178	0.003	0.058	0.067
32	Non invasive	Female	29	9	intrascalar	2	ST MIXED	Acromegaly	17.9	7.86	564									1.997	0.002	0	0	0.024	0.012	0.107	0.142
33	Invasive	Female	43	14	extrascalar	1	ST	Acromegaly	30.9	680										3.507	0.001	0	0.014	0.263	0.01	0.099	0.208
34	Non invasive	Male	55	4	intrascalar	<1	ST	Acromegaly	11.5	847										2.012	0.007	0.01	0.005	0.037	0.199	0.767	2.687
35	Invasive	Male	57	22	extrascalar	<1	ST	Acromegaly	7.99	817										1.22	0.031	0.01	0	0.004	0.004	0.081	0.128
36	Non invasive	Male	40	16	intrascalar	1	ST MIXED	Acromegaly	91.2	10.2	1201									0.698	0.006	0	0.001	2.801	0.005	0.039	0.133
37	Invasive	Female	35	43	Invasive	1	ST	Acromegaly	6.72	1088										3.822	0.005	0.01	0	0	0.001	0	0
38	Non invasive	Female	59	13	intrascalar	0	ST	Acromegaly												1.101	0.254	0.01	0.004	0.041	0.029	0.113	0.123
39	Invasive	Female	41	19	Invasive	4	ST	Acromegaly	6.29	795										0.349	0.004	0	0.001	0.027	0.126	0.811	1.531
40	Non invasive	Female	35	29		1	ST	Acromegaly	0.72	589										2.073	0.004	0	0.003	0	0	0.024	0.012
41	Invasive	Female	25	45	Invasive	10	ST	Acromegaly	8.62	992										0.227	0.001	0.01	0.001	0	0	0.025	0.005
42	Invasive	Male	37	21	Invasive	2	ST	Acromegaly	48.8	1396										0.179	0.003	0	0.017	0.006	0.003	0.005	0.011
43	Non invasive	Female	34	6	intrascalar	ST		Acromegaly	2.77	298										2.284	0.019	0.07	0.404	0.18	0.031	0.029	0.08
44	Non invasive	Male	53	12	intrascalar	1	ST MIXED	Acromegaly	119.9	8.68	1095									0.055	0	0	0.004	131.503	0	0	0.001
45	Invasive	Female	21	30	Invasive	1	PH	Acromegaly												0.629	0	0	0.102	0.165	0.001	0.001	0.002

Case	Invasiveness	Sex	Age (years)	MTD	Extension	tk67 IHC	IHC subtype	Clinical subtype	Biochemistry					Fold Change															
									PRL	GH	IGF1	Cortisol	ACTH	UFC	TSH	FT4	Molecular subtype	GH	FSH	LH	TSH	PRL	POMC	AVPR1B	CRHR1				
46	Non invasive	Male	36	14	intrascalar	2	PH	Acromegaly													35,75	0,019	0,02	0,01	2,925	0,001	0	0	
47	Non invasive	Female	69	15		1	ST	Acromegaly	3,9	533											0,191	0,249	0,01	0,009	0,232	0,073	0,101	0,68	
48	Invasive	Male	41	16	Invasive	<1	ST MIXED	Acromegaly	3,2	651											0,174	0	0	0,005	0,059	0,009	0,003	0,019	
49	Non invasive	Male	32	15	intrascalar	3	ST MIXED	Acromegaly	24,7	809											1,777	0,001	0	0,059	1,632	0,005	0,004	0,093	
50	Non invasive	Male	44	15	intrascalar	<1	PH	Acromegaly													37,35	0,014	0,09	15,39	24714,04	0,001	0,001	0,019	
51	Invasive	Female	39	15		1	ST	Acromegaly	14,9	818											1,169	0,002	0	0	0,033	0,046	0	0,113	
52	Invasive	Female	67		Invasive	<3	ST MIXED	Acromegaly	7,7	2,16	549										0,109	0,001	0	3,198	1,921	0,001	0,001	1,58	
53	Non invasive	Male	40	23	extrascalar	2	ST	Acromegaly	50	1525											0,65	0,019	0,01	0,01	0,156	0,433	0	2,18	
54	Non invasive	Female	43	14	intrascalar	1	ST MIXED	Acromegaly	47	33,1	893										0,831	0,001	0	0,007	1,598	0	0	0	
55	Invasive	Female	56	30	Invasive	0	ST	Acromegaly	13,2	1309											0,534	0,002	0	0,001	0	0,001	0	0,039	
56	Non invasive	Female	51	15	extrascalar	<2	ST	Acromegaly	13	1303											0,476	0	0	0,024	0,007	0	0	0	
57	Invasive	Female	27	28	Invasive	5	ST	Acromegaly	53,8	954											2,93	0	0	0,001	0,005	0,002	0,022	0,003	
58	Invasive	Male	32	25	extrascalar	2	ST	Acromegaly	33	1203											3,624	0	0	0,004	0,026	0	0	0,002	
59	Non invasive	Female	68	14	intrascalar	1	ST	Acromegaly	97	1293											4,379	0,001	0,01	0,071	0,07	0	0,001	0,003	
60	Non invasive	Female	54	14	intrascalar	1	ST	Acromegaly	1,5	1089											0,274	0	0	0,105	0,017	0	0,001	0,002	
61	Non invasive	Female	43	4	intrascalar	<3	ST MIXED	Acromegaly	7,36	589											3,225	32,64	0,06	0	7,269	0,003	1,792	68,544	
62	Invasive	Female	58	22	extrascalar		ST MIXED	Acromegaly	6,6	161	1089										1,921	0	0	0,011	0,018	0	0	0	
63	Non invasive	Male	37	12	intrascalar		ST	Acromegaly	6,45	551											0,134	0	0	0	0,006	0,002	0,017	0,057	
64	Non invasive	Male	47	10	extrascalar		ST	Acromegaly	14,3	903											0,04	0,022	0,01	2,297	0,061	0,018	0,034	0,597	
65	Invasive	Female	47	30	extrascalar	<1	ST MIXED	Acromegaly													0,197	0,006	0	0,153	0,112	0,022	0,016	0,044	
66	Non invasive	Female	51	18	extrascalar	<1	ST MIXED	Acromegaly													0	1,504	0,01	0,012	0	0	0	0,417	
67	Invasive	Female	62	35	extrascalar	2	ST MIXED	Acromegaly													0,044	0	0	1,203	0,355	0	0	0,002	
68	Non invasive	Male	35	15	extrascalar	<1	ST	Acromegaly			1264										1,591	0,006	0	0,004	0,048	0,351	0,705	3,423	
69	Invasive	Female	41	25	extrascalar	1	CT	Cushing			22,9	113,5	23								0	0	0	0,002	0,001	12,853	53,269	42,651	
70	Non invasive	Female	65	6	intrascalar	<1	CT	Cushing			50	100									0,007	0,039	0	0,011	0,095	0,173	0,56	0,445	
71	Non invasive	Female	45	17	intrascalar	<1	PH	Cushing													0	0	0	0	0,001	27,396	3,296	19,928	
72	Invasive	Female	45	12	Invasive	3	PH	Cushing													0	0	0	0,026	0,02	8,606	4,234	20,512	
73	Non invasive	Female	28	6	intrascalar	1	PH	Cushing													0,261	0,257	0,35	6,076	5,854	6,468	0,287	4,566	
74	Invasive	Female	39	5	intrascalar	1	CT	Cushing			40,7	179	161								0,286	0,823	0,31	0,001	0,875	7,381	46,162	65,681	
75	Non invasive	Female	39	6	intrascalar	0	PH	Cushing													1,632	0,212	0,73	0,083	0,035	0,314	2,077	1,081	
76	Non invasive	Female	45	8	intrascalar	<1	NULL	Cushing													0,001	0,003	0	0	0,016	2,738	42,542	12,235	
77	Invasive	Female	38	9	intrascalar	2	PH	Cushing													0,002	0,001	0	0	0,087	2,694	18,494	36,641	
78	Non invasive	Female	33	7	intrascalar	0	PH	Cushing													0,005	0,011	0,01	0	0,035	11,569	36,91	62,206	
79	Non invasive	Female	35	25	extrascalar	3	PH	Cushing													0	0	0	0	0	0,197	5,902	0,304	
80	Invasive	Female	68	13	extrascalar	1	PH	Cushing													0	0	0	0	0	1,017	19,798	1,574	
81	Non invasive	Male	31	6	intrascalar	<1	CT	Cushing			24,1	235	187								0,036	0,795	1,95	0,002	0,932	0,81	1,316	2,608	
82	Non invasive	Female	28	8	intrascalar	7	CT	Cushing			23,7	57,8	104,22								0	0,001	0	0	0	0	1,858	47,589	50,139
83	Non invasive	Female	39	7	intrascalar	<1	CT	Cushing			23,8	69,9	1424,9								0,002	0,005	0	0	0,023	5,534	38,274	53,548	
84	Non invasive	Female	22	6	intrascalar	2	PH	Cushing													0,168	0,106	0,06	0,029	0,496	4,869	59,396	37,842	
85	Invasive	Female	52	25	Invasive	2	ST	Cushing	1,01	182											0,001	0,001	0	0	0	1,276	10,153	16,165	
86	Non invasive	Female	44	13		3	PH	Cushing													0	0,002	0	0	0,036	21,887	0,826	1,025	
87	Non invasive	Female	68	9	intrascalar	2	NULL	Cushing													0	0,002	0	0,003	0	11,722	24,512	69,236	
88	Non invasive	Female	36		intrascalar	2	PH	Cushing													0	0	0	0	0	0	0,833	52,536	23,915
89	Non invasive	Female	44	8	intrascalar	<1	PH	Cushing													0,038	5,542	1,66	12,43	0,824	1,152	2,424	8,353	
90	Non invasive	Female	54	9	intrascalar		PH	Cushing													0,001	0,004	0	0,002	0,015	0,227	0,288	1,192	

Case	Invasiveness	Sex	Age (years)	MTD	Extension	tk67	IHC	IHC subtype	Clinical subtype	Biochemistry					Fold Change							
										PRL	GH	IGF1	Cortisol	ACTH	UFC	TSH	FT4	Molecular subtype	GH	FSH	LH	TSH
136	Invasive	Female	67		Invasive		1	PH	Non-functioning						0,016	0,089	0,03	0,158	0,327	0,118	0,064	0,218
137	Non invasive	Female	69	20	extraselar	<1	GT		Non-functioning						0	2,477	0,01	0,017	0	0	0	0,076
138	Invasive	Male	49	46	extraselar	<1	GT		Non-functioning						0	0,365	0,14	0,002	0	0	0,002	0,065
139	Non invasive	Female	60	34	extraselar		1	GT	Non-functioning						0	0,545	0,01	0,007	0	0	0,001	0,016
140	Non invasive	Female	49	15	extraselar	2,5	NULL		Non-functioning						0	0	0	0,003	0,003	0,003	7,084	0,009
141	Non invasive	Male	51	31	extraselar	6	IT		Non-functioning					4,05	0,5	0	1,555	0	0,115	0	0,006	0,016
142	Non invasive	Male	40	16	extraselar	1	IT		Non-functioning							0	0	0	6,064	0,169	0	0
143	Non invasive	Male	53	24		1,2	GT		Non-functioning						0	0,232	0,01	0,032	0	0	0,01	0,249
144	Non invasive	Male	50	22	extraselar	1,2	GT		Non-functioning						0	4,645	0,04	0,004	0	0	0	0,103
145	Invasive	Female	70	33	Invasive	1	GT		Non-functioning						0	3,371	0	0,011	0,002	0,017	0,034	0,267
146	Invasive	Male	71	20	extraselar	0,5	GT		Non-functioning						0	0,05	0	0,007	0	0	0,001	0,21
147	Invasive	Female	49	20	Invasive	2,5	CT		Non-functioning				8,6		0	0,24	0	0,009	0	0	0,001	0,014
148	Invasive	Male	41	29	extraselar	1,8	GT		Non-functioning						0	0,029	0	0	0	0	0,015	0,148
149	Invasive	Male	72	48	Invasive	1,2	GT		Non-functioning						0	0,207	0	0,04	0	0,001	0,004	0,021
150	Invasive	Female	65	21	intraselar	<1	GT		Non-functioning						0	0,588	0	0,077	0,17	0,001	0,007	0,118
151	Non invasive	Male	75	19	extraselar	<1	GT		Non-functioning						0	5,216	0	1,044	0,001	0,013	0,005	0,025
152	Invasive	Male	50	27	extraselar	1,5	GT		Non-functioning						0	0,24	0	0,009	0	0	0,002	0,016
153	Non invasive	Female	44	14	intraselar	<1	CT		Non-functioning						0,852	0,013	0	0,135	8,34	17,509	2,394	22,071
154	Invasive	Male	62	20		<1	GT		Non-functioning						0	0,498	0,01	0,018	0	0	0	0,011
155	Invasive	Female	48	15		1,2	ST		Non-functioning			2,29	237		0,155	0,022	0,01	0,054	5,169	0,792	0,452	1,127
156	Invasive	Male	73	23		1,2	GT		Non-functioning						0	0,043	0	0,023	0	0	0,001	0,091
157	Non invasive	Male	37	9		1,5	ST MIXED		Non-functioning						0,616	0	0	0,01	10,933	0	0	0,005
158	Non invasive	Male	52	12		<1	ST		Non-functioning			1,09	352		0,222	0,179	0,11	0,052	1,579	0,137	0,404	0,733
159	Invasive	Female	83	34	Invasive	1,2	NULL		Non-functioning						0	0,596	0	0,107	0	0	0,005	0,01
160	Non invasive	Male	51	27	extraselar	2	CT		Non-functioning				17,1	135,6	190	0	0	0,003	0	1,611	14,685	1,095
161	Invasive	Male	38		Invasive	0,8	GT		Non-functioning						0	0,062	0,01	0,008	0,001	0	0,001	0,171
162	Invasive	Female	67	28	extraselar	0,3	NULL		Non-functioning						0	0,81	0,06	0,018	0	0	0	0,039
163	Non invasive	Female	41	20		1,5	NULL		Non-functioning						0	0	0	0,006	0	0	12,113	0,004
164	Invasive	Male	43	25		2	ST		Non-functioning						0,006	0	0	0,09	0,002	0	0,001	0,002
165	Invasive	Male	43	32	extraselar	1	NULL		Non-functioning						0	0,496	0	0	0	0	2,553	0
166	Non invasive	Male	60				NULL		Non-functioning						0	0,103	0,02	0	0,001	0	0	0,938
167	Invasive	Female	49	41	extraselar		GT		Non-functioning						0	0,101	0,03	0,209	0	0	1,498	0,084
168	Invasive	Female	55	28	extraselar	<1	NULL		Non-functioning						0	0,051	0,01	0	0	0,014	23,097	0,336
169	Invasive	Female	38	12	extraselar	5	ST MIXED		Non-functioning				133		0,006	0,023	0,14	0,024	0,388	0,119	0,159	0,564
170	Invasive	Male	72	24	Invasive	<1	PH		Non-functioning						0	0,007	0	0,147	0	0,001	0	0,046
171	Invasive	Male	61	42	Invasive		PH		Non-functioning						0	0,193	0	0	0	0	0	0,03
172	Invasive	Male	70	18	Invasive	2	ST MIXED		Non-functioning						0	1,773	0,08	0,003	0,001	0,015	0	0
173	Invasive	Male	58	24	extraselar	<1	PH		Non-functioning						0	0,215	0	3,548	0	0,001	0	0,081
174	Invasive	Male	70	21	extraselar		NULL		Non-functioning						0	0	0	0	0	0	0	0
175	Non invasive	Female	50	16	intraselar	<1	PH		Non-functioning						0,102	0,296	0,1	0,011	1,892	5,059	91,359	64,759
176	Invasive	Female	35	30	extraselar	1	ST MIXED		Non-functioning				131		0	0,001	0	0	0	6,226	24,613	36,989
177	Invasive	Male	62	40	extraselar	1	NULL		Non-functioning						0,003	0,001	0	0,002	0,002	0,001	0,003	0,024
178	Invasive	Female	17	8	intraselar	<1	PH		Non-functioning						0,76	0,474	0,75	0,228	0,019	2,298	6,004	15,491
179	Invasive	Male	62	33	Invasive	2	NULL		Non-functioning						0	0,173	0,1	0	0	0,001	0	0,181
180	Invasive	Female	55	35	Invasive	<1	NULL		Non-functioning						0	7,025	0	0	0,001	0,001	0,001	0,253

Anexos

Case	Invasiveness	Sex	Age (years)	MTD	Extension	IHC	IHC subtype	Clinical subtype	PRL	GH	IGFI	Biochemistry				Molecular subtype	GH	FSH	LH	TSH	Fold Change			
												Cortisol	ACTH	UFC	TSH FT4						PRL	TSH	LH	PRL
226	Invasive	Female	28	30	extralaxel	<1	NULL	Non-functioning							TT	0	1,459	0	4,964	0,001	0	0	2,255	
227	Invasive	Male	36	38	Invasive	1	NULL	Non-functioning							NULL	0	0,001	0	0,04	0	0	0	0,012	
228	Invasive	Male	70	28	Invasive	<1	ST	Non-functioning							GT	0	0,553	0,11	0	0	0	0	0,102	
229	Non invasive	Female	69	27	extralaxel	1	PH	Non-functioning							CT	0	0	0	0	0,004	3,629	67,419	72,3	
230	Non invasive	Male	62	44	extralaxel	3	CT	Non-functioning							GT	0,011	0,769	0,29	0,001	0,001	0,01	1,406	0,083	
231	Non invasive	Female	51	18	extralaxel	<1	PH	Non-functioning							TT	0,001	0,033	0	0,448	0	0,001	0,108	0,024	
232	Invasive	Male	58	22	Invasive	<1	GT	Non-functioning						19,5	PH	1,629	1,509	0,13	0,174	0,058	0,059	31,988	0	
233	Non invasive	Female	27	14	extralaxel	<5	CT	Non-functioning							CT	0,001	0	0	0	0,002	7,411	21,61	15,951	
234	Invasive	Female	51	28	Invasive	2	GT	Non-functioning							NULL	0	0,19	0,11	0,001	0,001	0	0	0,12	
235	Non invasive	Male	75	23	extralaxel	2	NULL	Non-functioning							NULL	0	0,045	0,02	0,003	0	0	0	0,03	
236	Invasive	Male	78	40	Invasive	2	NULL	Non-functioning							NULL	0	0,064	0	0,004	0	0	0	0,31	
237	Invasive	Male	65	28	extralaxel	<2	NULL	Non-functioning							TT	0,001	0,044	0,02	1,755	0,002	0,003	0	0	
238	Non invasive	Female	77	30	extralaxel	<1	GT	Non-functioning							GT	0	3,769	0,02	0,045	0,004	0	0	0	
239	Invasive	Female	58	28	Invasive	<5	GT	Non-functioning							GT	0,007	2,261	0,03	0,027	0,002	0	0,01	0,071	
240	Invasive	Male	63	35	Invasive	<5	GT	Non-functioning							GT	0	1,603	0	0,012	0	0	0,001	0,012	
241	Invasive	Male	73	21	extralaxel	<1	NULL	Non-functioning							GT	0	0,339	0	0,012	0,001	0	0	0,028	
242	Non invasive	Male	62	30	extralaxel	1	NULL	Non-functioning							GT	0	0,186	0	0,013	0	0	0,001	0,08	
243	Non invasive	Female	68	21	extralaxel	<2	LT	Non-functioning	125,2						GT	0	0,231	0	0,006	0,033	0,001	0,002	0,283	
244	Invasive	Male	40	20	intralaxel	<2	GT	Non-functioning							GT	0	0,536	0	0,023	0,001	0	0	0,03	
245	Invasive	Female	50	31	extralaxel	4	LT	Non-functioning	8,6						GT	0	0,689	0	0,024	0	0	0,055	0,468	
246	Non invasive	Male	48	38	extralaxel	1	ST MIXED	Non-functioning	21,7	0,43	243				GT	0	2,467	0,02	0,006	0,001	0,006	0,156	0,321	
247	Invasive	Female	74	40	Invasive	1	LT	Non-functioning	72,3						GT	0	0,158	0,04	0	0	0	0	0,429	
248	Invasive	Male	73	27	Invasive	2	NULL	Non-functioning							GT	0	2,609	0,19	0,002	0,001	0,001	0	0,159	
249	Non invasive	Male	68	21	intralaxel	1	LT	Non-functioning	12,9						GT	0	0,536	0,01	0,003	0,028	0,013	0,221	0,251	
250	Non invasive	Female	39	15	extralaxel	2	PH	Non-functioning							PH	0,036	0,632	0,13	0,257	2,417	0,483	10,108	7,428	
251	Non invasive	Female	53	12	extralaxel	1	NULL	Non-functioning							CT	0	0,003	0	0	0	0	0,011	110,608	0,158
252	Invasive	Male	42	41	Invasive	<5	NULL	Non-functioning							GT	0	0,975	0,01	0	0	0	0	0,004	0,117
253	Invasive	Female	63	35	extralaxel		NULL	Non-functioning							NULL	0	0	0	0	0	0	0	0,721	0,746
254	Invasive	Female	46	36	extralaxel		ST MIXED	Non-functioning							NULL	0	0,054	0,04	0	0	0	0	0,049	0,294
255	Invasive	Female	65	52	extralaxel	<1	NULL	Non-functioning							GT	0	8,411	0	0	0	0	0	0,191	0,036
256	Non invasive	Male	42	17	intralaxel		ST MIXED	Non-functioning	5,3	0,3	206				NULL	0,011	0,001	0	0,001	0,053	0,001	0,002	0,012	
257	Invasive	Female	42	22	extralaxel	1	NULL	Non-functioning							TT	0,001	0	0	2,299	0	0,001	1,912	0,046	
258	Non invasive	Male	66	21	extralaxel	2	NULL	Non-functioning							NULL	0	0,017	0,01	0,004	0	0	0	0,001	0,03
259	Non invasive	Female	32	15	intralaxel		ST	Non-functioning							PH	0,027	0,049	0,06	1,76	2,381	0,198	0,164	0,239	
260	Invasive	Male	84	36	Invasive	<1	NULL	Non-functioning							GT	0	6,34	0	0,044	0,001	0,001	0,003	0,045	
261	Non invasive	Male	70	17	extralaxel		NULL	Non-functioning							GT	0	7,198	0,05	0,004	0,006	0,005	0,01	0,166	
262	Invasive	Female	51	24	Invasive	<4	NULL	Non-functioning							GT	0	0,383	0,06	0,092	0,014	0,008	0,016	0,159	
263	Non invasive	Male	55	15			1	NULL	Non-functioning						NULL	0	0,076	0	0,014	0	0	0	0,002	0,019
264	Invasive	Male	38	35			2	GT	Non-functioning						GT	0	0,304	0	0	0,001	0	0,001	0,001	0,01
265	Invasive	Male	36	15			2,5	CT	Non-functioning						CT	0	0	0	0	0,011	12,483	4,9	38,751	
266	Invasive	Male	17	18			1,5	CT	Non-functioning						CT	0	0,001	0	0	0	0	0,24	1,482	0,002
267	Non invasive	Female	62		extralaxel		CT	Non-functioning							NULL	0	0	0	0	0	0	0,001	0,083	0,003
268	Non invasive	Male	55	55	intralaxel		CT	Non-functioning							GT	0,001	0,495	0,02	0,016	0,012	0,005	0,003	0,241	

IHC, immunohistochemistry; F-, functioning; S-, silent; ST, somatotroph tumor; ST Mixed, somatotroph-lactotroph tumor; CT, corticotroph tumor; LT, lactotroph tumor; TT, thyrotroph tumor; GT, gonadotroph tumor; PH, plurihormonal; NC, null cell tumor.

Artículos

ARTÍCULO 1

Cancers 2019, 11(12), 1990; <https://doi.org/10.3390/cancers11121990>. IF: 6.162. Q1

How valuable is the RT-qPCR of specific-pituitary transcription factors for identifying pituitary neuroendocrine tumor subtypes according to the new WHO 2017 criteria?

Torregrosa-Quesada M^a Eugenia^{1&}, Araceli García-Martínez^{2&}, Sandra Silva-Ortega³, Sebastián Martínez-López², Rosa Cámara⁴, Carmen Fajardo⁵, Cristina Lamas⁶, Ignacio Aranda³ and Antonio Picó^{7*}

¹Biochemical Department, Hospital General Universitario de Alicante, Spain; eugenia_torregrosa@hotmail.com

² Research Laboratory, Hospital General Universitario de Alicante -ISABIAL, Alicante, Spain; araceli86gm@gmail.com, sebastian.martinez@goumh.umh.es

³ Pathology Department, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain; ssilvaortega@yahoo.es, ignaranda@gmail.com

⁴ Endocrinology Department, Hospital Universitario Politécnico La Fe, Valencia, Spain; rosacamaragomez@gmail.com

⁵Endocrinology Department, Hospital Universitario La Ribera, Alzira, Valencia, Spain; fajardo_carmon@gva.es

⁶ Endocrinology Department, Complejo Universitario de Albacete, Albacete, Spain; clamaso@sescam.jccm.es

⁷ Endocrinology Department, Hospital General Universitario de Alicante -ISABIAL, Miguel Hernández University, Alicante, Spain; antonio.pico@umh.es

& These authors contributed equally to this study and share first authorship

*Correspondence: antonio.pico@umh.es; Tel.: + 34 659467594

Received: 13 September 2019; Accepted: 28 November 2019; Published: 11 December 2019.

Abstract:

The classification of pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) subtypes continues generating interest. In 2017, the World Health Organization (WHO) proposed considering the immunohistochemical (IHC) analysis of pituitary-specific transcription factors (TF) for their typification. The present study targeted the quantification of pituitary-specific TF (*TPIT*, *PIT-1*, *SF-1*, *GATA2*, *ESR1*) gene expression by RT-qPCR to overcome the shortcomings of IHC and to complement it. We analyzed 251 tumors from our collection of PitNETs and performed additional IHC studies in a subset of 56 to analyze the concordance between gene and protein expression of the TF. The molecular and IHC studies allowed us to significantly reduce the percentage of null cell tumors in our series, most of which were reclassified as gonadotroph tumors. The concordance between the molecular and immunohistochemical studies was good for tumors coming from the corticotroph and Pit-1 lineages but worsened for the rest of the tumors. Indeed, the RT-qPCR helped to improve the typification of plurihormonal Pit-1 and unusual tumors. Overall, our results suggest that the RT-qPCR of specific-pituitary TF and hormone genes could help pathologists, endocrinologists and neurosurgeons to improve the management of patients with pituitary tumors.

Artículos

Keywords: pituitary-specific transcription factor genes, pituitary-specific transcription factor proteins, pituitary-specific hormone genes, pituitary neuroendocrine tumors, classification of pituitary tumors

1. Introduction

The *WHO Classification of Tumors of Endocrine Organs*, in its fourth edition, bases the classification of pituitary tumors on specific transcription factors, namely pituitary-specific positive transcription factor 1 (Pit-1), Tbox family member *TPIT* (Tpit), and steroidogenic factor 1 (SF-1), involved in the differentiation of anterior pituitary cells [1]. The classification recognizes seven main subtypes of pituitary tumors: somatotroph tumors (ST), lactotroph tumors (LT), thyrotroph tumors (TT) -all of Pit-1 lineage-, corticotroph tumors (CT) (Tpit lineage), gonadotroph tumors (GT) (SF-1 lineage), null cell (NC) tumors (no lineage) and plurihormonal tumors (Pit-1 lineage or variable combination of other transcription factors).

Pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs), as they have been recently named [2], have increased in frequency mainly as a result of the exponential increase in cranial imaging techniques. A meta-analysis of 33 articles based on autopsy and radiological data showed that the prevalence of PitNETs ranged from 1% to 40% in the imaging studies, with similar results in the postmortem studies. On the basis of these data, the authors estimated an overall prevalence of PitNETs of 16.7% in the general population [3]. More recently, a nationwide study showed a prevalence of pituitary tumors of 115.57/100.000, with LTs being the most prevalent subtype, followed by non-functioning pituitary adenomas (NFPAs). However, over the whole surveillance period (1952-2012), NFPAs were the most frequently diagnosed tumors [4].

NFPAs are PitNETs without signs or symptoms of hormone hypersecretion but whose growth can produce local pressure, resulting in visual impairment, headache, vomiting, diplopia or dizziness. Nowadays, these tumors are known as silent pituitary tumors or silent PitNETs (sPitNETs). They are more invasive and recur more frequently than functioning ones [5]. Indeed, the 2017 WHO classification of pituitary tumors highlights the importance of recognizing the specific tumor subtypes that show aggressive behavior, among them the sparsely granulated ST (frequently silent), the silent CT, and the plurihormonal Pit-1-positive tumor (formerly known as silent subtype 3 adenoma).

Given the increasing detection of PitNETs and their potential to produce clinical problems, an early and accurate diagnosis could have far-reaching benefits. Since a GT does not share the same characteristics and behavior as a CT, it is important to properly identify the tumor subtype. However, most of the studies published until now have considered the sPitNETs as a single tumor type, with silent CTs the occasional exception.

In the era of precision medicine, targeted therapeutic approaches require identifying tumors as precisely as possible. The measurement of specific transcription factors' expression will enable a better classification of the different PitNET subtypes, facilitating a more accurate approach to them. However, the 2017 WHO classification, like previous ones, is still based on immunohistochemistry (IHC). However, IHC has several shortcomings. In fact, we have observed important variability in the IHC results among four pathology departments participating in the typification of a large series of PitNETS [6]; moreover, the technique showed limitations in the identification of NC and plurihormonal tumors. The evaluation of transcription factors will hopefully resolve this problem, but interobserver variability will persist. On the other hand, we have recently demonstrated that the RT-qPCR of pituitary-specific hormone genes complements IHC studies, reducing the percentage of NC and unusual plurihormonal (UPH) tumors[6,7].

Consequently, the present study aims to typify a large series of PitNETs according to the gene expression profiling of transcription factors, following the 2017 WHO guidelines, and to calculate the concordance between IHC and the molecular analysis of transcription factors in a subset of fully studied tumors in a single center.

2. Results

2.1. Patients

In the present study, we investigated the gene expression of the pituitary-specific transcription factors in 251 PitNETs previously categorized in subtypes according to their pituitary-specific hormone gene profile (Fig. 1). Of these, 168 PitNETs were silent tumors, 41 of which were NC tumors and 71, GTs. In addition, the same transcription factors were also studied by IHC in a subset of 56 tumors, 9 of which were NC tumors and 19 were GTs. The remaining silent tumors included silent CTs, TTs, STs and LTs, and silent Pit-1 and UPH tumors.

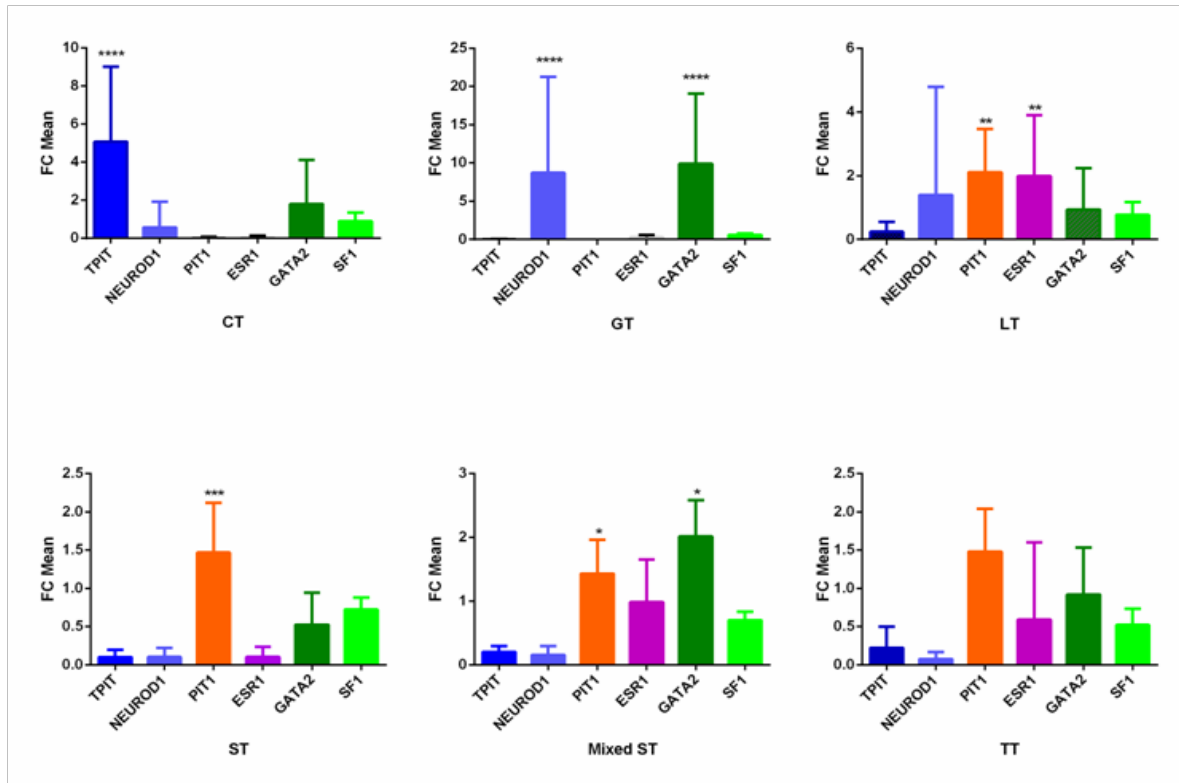


Figure 1. Mean fold change of transcription factors' gene expression. FC, fold change; CT, corticotroph tumors; GT, gonadotroph tumors; LT, lactotroph tumors; ST, somatotroph tumors; TT, thyrotroph tumors; **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests.

The demographic, clinical, biochemical, immunohistochemical and molecular characteristics of the 251 patients are shown in Supplemental Table 1. There was discordance between the molecular and immunohistochemical identification of the PitNET subtypes in some patients. This discordance was attributed to the fact that the IHC studies were performed in different pathology departments, whereas the RT-qPCR was centralized in the Research Laboratory of the Alicante General University Hospital [6].

2.2. Identification and Frequency of PitNET Subtypes According to the Gene and Protein Expression of Pituitary Specific Hormones

The pituitary-specific hormone genes used to identify the PitNET subtypes were *GH*, *FSH*, *LH*, *TSH*, *PRL*, *POMC*, *AVPR1B* and *CRHR1*. **Table 1** shows the frequency of the different PitNET subtypes based on the expression of pituitary-specific hormone genes in the whole sample and in the

IHC evaluation of pituitary hormone proteins in the subset. The most prevalent subtypes in the RT-qPCR study were GT and ST, followed by CT and NC. In the IHC study the most prevalent subtype also was GT and ST, followed by NC and CT.

Table 1. Frequency of PitNET subtypes identified according to the gene (a) (whole series) and protein (b) (subset) expression of pituitary-specific hormones

PitNET	(a)	(b)
	Molecular n (%) Hormones	IHC n (%) Hormones
ST	46 (18.3)	12 (21.4)
F-ST	44 (95.6)	11 (91.7)
S-ST	2 (4.3)	1 (8.3)
LT	17 (6.8)	4 (7.1)
F-LT	8 (47.1)	4 (100)
S-LT	9 (52.9)	0 (0.0)
TT	14 (5.6)	3 (5.4)
F-TT	3 (21.4)	1 (33.3)
S-TT	11 (78.6)	2 (66.7)
PH Pit-1	5 (2.0)	0 (0.0)
F-PH Pit-1	4 (80)	
S-PH Pit-1	1 (20)	
CT	44 (17.5)	7 (12.5)
F-CT	19 (43.2)	2 (28.6)
S-CT	25 (56.8)	5 (71.4)
GT	71 (28.2)	19 (33.9)
NC	41 (16.3)	9 (16.1)
UPH	13 (5.2)	2 (3.6)
UPH-F	5 (38.5)	0 (0.0)
UPH-S	8 (61.5)	2 (100)
Total	251 (100)	56 (100)

PitNET, pituitary neuroendocrine tumor; IHC, immunohistochemistry; F, functioning; S, silent; PH, plurihormonal; NC, null cell tumor; UPH, unusual plurihormonal tumor

2.3. Identification and frequency of PitNET Subtypes According to the Gene and Protein Expression of Pituitary-Specific Transcription Factors

Identifying dominant gene (251 tumors) and protein (56 tumors) expression of the pituitary-specific transcription factors allowed us to classify our collection of tumors as CTs, GTs, Pit-1 cell lineage tumors, UPH, and NC tumors. Besides the pituitary-specific transcription factor that defined the different PitNET subtypes, most tumors expressed all or some of the other transcription factors in different amounts (Table 2 and Fig. 1). Remarkably, CTs expressed TPIT (Tpit) but also GATA2, while the GTs expressed GATA2 and NEUROD1.

Table 2. Molecular expression of transcription factors in the whole sample.

Molecular Subtype (n)	<i>PIT-1</i> mRNA n (%)	<i>TPIT</i> mRNA n (%)	<i>SF-1</i> mRNA n (%)	<i>GATA2</i> mRNA n (%)	<i>NEUROD1</i> mRNA n (%)	<i>ESR1</i> mRNA n (%)
ST (50)	48 (96)	0 (0)	5 (10)	6 (12)	8 (16)	4 (8)
GT (71)	0 (0)	2 (2.82)	26 (36.62)	62 (87.32)	53 (74.65)	3 (4.22)
CT (44)	3 (6.82)	38 (86.36)	7 (15.90)	9 (20.45)	18 (40.90)	0 (0)
TT (14)	10 (71.43)	1 (7.14)	1 (7.14)	7 (50)	5 (35.71)	1 (7.14)
LT (13)	10 (76.92)	1 (7.69)	1 (7.69)	5 (38.46)	2 (15.38)	7 (53.85)
UPH (13)	5 (38.46)	3 (23.07)	3 (23.07)	7 (53.85)	8 (61.54)	3 (23.08)
PH-Pit-1 (5)	5 (100)	0 (0)	1 (20)	1 (20)	2 (40)	0 (0)
NC (41)	4 (9.76)	2 (4.88)	7 (17.07)	38 (92.68)	25 (60.97)	2 (4.88)

ST, somatotroph tumor; GT, gonadotroph tumor; CT, corticotroph tumour; TT, thyrotroph tumor; LT, lactotroph tumor; UPH, unusual plurihormonal tumor; NC, null cell tumor.

Table 3 shows the transcription factor gene and protein expression profiles of the different PitNET subtypes of the subset, and Figure 2 shows representative immunohistochemical positive pictures. Moreover, the absolute and relative frequency of the different PitNET subtypes according to their gene or protein expression of transcription factors are summarized in Table 4. The GTs were the most prevalent tumors, followed by tumors of the Pit-1 cell lineage and CTs, whereas the percentage of NC tumors was drastically reduced compared with the previous classification.

Table 3. IHC and molecular expression of transcription factors in the subset of samples

Subtype IHC (n)	Pit-1 IHC n (%)	mRNA n (%)	Tpit IHC n (%)	mRNA n (%)	SF-1 IHC n (%)	mRNA n (%)	GATA2 mRNA n (%)
ST (12)	12 (100)	12 (100)	0	0	2 (16.66)	1 (8.33)	4 (33.33)
GT (19)	2 (10.53)	0	1 (5.26)	0	18 (94.74)	2 (10.53)	17 (89.47)
CT (7)	0	0	7 (100)	7 (100)	0	1 (14.28)	3 (42.86)
TT (3)	2 (66.66)	2 (66.66)	0	0	0	0	2 (66.66)
LT (4)	4 (100)	3 (75)	0	0	0	1 (25)	1 (25)
UPH (2)	1 (50)	0	0	0	1 (50)	0	2 (100)
NC (9)	2 (22.22)	0	0	0	9 (100)	1 (11.11)	8 (88.88)

IHC, immunohistochemistry; ST, somatotroph tumors; GT, gonadotroph tumors; CT, corticotroph tumors; TT, thyrotroph tumors; LT, lactotroph tumors; UPH, unusual plurihormonal tumors; NC, null cell tumors.

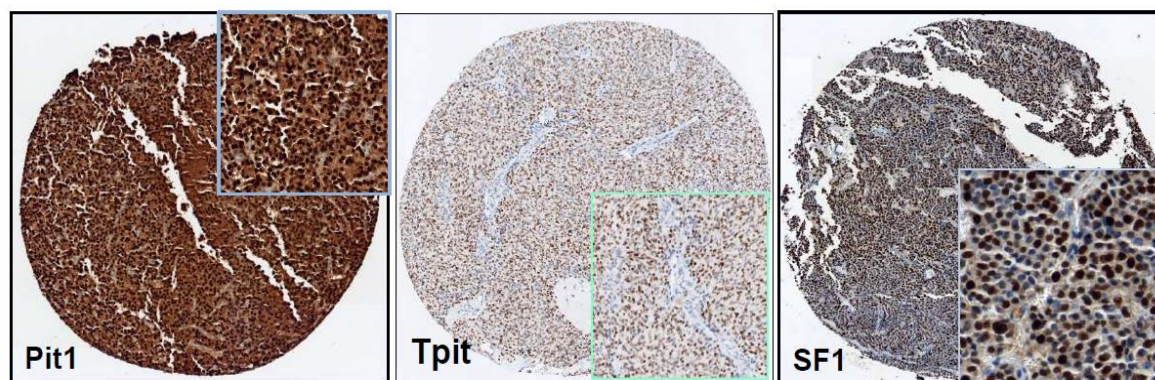


Figure 2. Representative images of immunohistochemical transcription factor expressions

Table 4. Frequency of PitNET subtypes identified according to the molecular and IHC expression of transcription factors in the whole and subset series, respectively.

PitNET	Molecular n (%) TF	IHC n (%) TF
Pit-1	79 (31.3)	17 (30.4)
Pit-1-F	64 (81.0)	14 (82.3)
Pit-1-S	15 (19.0)	3 (17.7)
CT	39 (15.5)	7 (12.5)
F-CT	18 (46.1)	2 (28.6)
S-CT	21 (53.9)	5 (71.4)
GT	111 (44.0)	23 (41.1)
NC	8 (3.2)	2 (3.6)
UPH	14 (5.6)	7 (12.5)
UPH-F	3 (21.4)	2 (28.6)
UPH-S	11 (78.6)	5 (71.4)
Total	251 (100)	56 (100)

PitNET, pituitary neuroendocrine tumor; TF, transcription factor; F, functioning; S, silent; CT, corticotroph tumor; GT, gonadotroph tumor; NC, null cell tumor; UPH, unusual plurihormonal tumor

2.4 Concordance between molecular and immunohistochemical identification of PitNET subtypes in the subset sample.

Table 5 shows the concordance in the identification of the PitNET subtypes between the gene (by RT-qPCR) and protein (by IHC) expression results of pituitary-specific transcription factors in the subset of 56 patients. Concordance was high between Tpit immunopositivity and *TPIT* expression, and between Pit-1 immunopositivity and *PIT-1* expression. However, there was no concordance between the level of expression of SF-1 by IHC and gene expression. Instead, the gene expression of *GATA2* was concordant with the IHC expression of SF-1; therefore, we considered it useful in the identification of GTs.

Table 5. Concordance between molecular and IHC transcription factors identification

Subtypes	IHC N	Molecular TF N	Kappa	p-value
CT	7	6	0.913	<0.001
GT	23	30	0.612	<0.001
Pit-1	17	15	0.825	<0.001
UPH	7	3	0.135	0.262
NC	2	2	-0.037	0.782

IHC, immunohistochemistry; TF, transcription factor; CT, corticotroph tumor; GT, gonadotroph tumor; UPH, unusual plurihormonal tumor; NC, null cell tumor

3. Discussion

This is the first report to characterize a large series of PitNETs (n = 251) according to the gene expression of pituitary-specific transcription factors, following the recommendations of the recently released 2017 WHO classification of pituitary tumors. We demonstrate good concordance between the molecular and immunohistochemical identification of the PitNET subtypes based on the expression of transcription factors in a subset of 56 patients. The strength of the study is that all the experiments were performed in a single center, in a surgical series of patients with complete clinical, biochemical, immunohistochemical, pathological, and molecular data. The most important limitation is that, occasionally, the molecular and immunohistochemical studies were performed in different areas of the same tumor. Moreover, the inclusion of samples with normal pituitary tissue hindered the interpretation of the molecular data in some cases. Therefore, samples that were suspected of being significantly contaminated were excluded from the study.

Tumors of endocrine organs produce hormones that can be associated to a specific clinical syndrome. This special characteristic has been used in their immunohistochemical identification with specific hormone antibodies [8]. However, the pituitary contains different cell lines responsible for producing specific hormones. Even though the 2004 WHO classification of pituitary tumors had the main advantage to consider the cytodifferentiation of the tumors, it failed to consider the transcription factors that target specific genes of these hormones. Indeed, the identification of these pituitary-specific transcription factors has allowed us to understand the plurihormonality shown by many PitNETs, providing new tools for a more specific and accurate typification of pituitary tumors, especially in the case of sPitNETs.

Nishioka et al. recently assessed the usefulness of the pituitary-specific transcription factors in the characterization of a large series of sPitNETs [9]. By studying 119 NC tumors by evaluating the expression of Pit-1, Tpit, SF-1 and estrogen receptor- α (ER α), the authors were able to reclassify 95% of the tumors as GTs, CTs, or Pit-1 derived tumors (LTs, STs, or TTs). On the basis of these and other results, the fourth edition of the WHO classification of endocrine tumors included a novel approach for classifying the PitNETs according to pituitary cell lineage [1]. This classification continues to be based on IHC for pituitary hormones, with the addition of the pituitary-specific transcription factors. However, the unavailability of well-trained staff and the difficulties in obtaining certain antibodies against the pituitary-specific transcription factors will make its worldwide implementation very difficult.

More and more frequently, the RT-qPCR of tumors is being incorporated into daily clinical practice. In the case of pituitary tumors, the gene expression quantification of the pituitary-specific transcription factors could give insights into the pathogenesis of these tumors and contribute to a better identification of different subtypes, especially the NC and plurihormonal ones. Indeed, previous results of our group addressed the complementary role of the RT-qPCR of pituitary-specific hormone genes and the IHC identification of PitNET subtypes. The percentage of NC and UPH tumors decreased from 12.7% to 7% and from 23.2% to 3.5%, respectively, in the first series [6] and from 17% to 12.5% and 17% to 9.8%, respectively, in the second one [7].

Similarly, the study of the gene expression of specific-pituitary transcription factors could complement their IHC analysis in the identification of PitNET subtypes according to the 2017 WHO classification of pituitary tumors.

Two corticotroph cell-specific regulators have been described: the basic helix-loop helix transcription factor NEUROD1 (*NEUROD1*) and the pituitary-restricted transcription factor, Tpit (*TPIT*). Both, NEUROD1 and Tpit exert their transcriptional effects on the activation of *POMC* transcription through their interaction with Pitx1 [10,11]. Indeed, Tpit coexpressed with *POMC* in both secreting and silent tumors of the corticotroph lineage, and has not been found in the other types of PitNETs. Therefore, Tpit could be considered a marker of CTs [12]. In our series, *TPIT* (Tpit) was expressed by 86.36% of CTs, 23.07% of UPH tumors and 4.88% of NC tumors, compared with 7.14% of TTs, 7.69% of LTs, 2.82% of GTs, and 0% of STs. In contrast, *NEUROD1* was expressed in all the PitNET subtypes, showing poor discriminatory utility.

Unexpectedly, the GTs of our series expressed levels of *SF-1* similar to those of other PitNET subtypes (Table 2, Fig. 1). Therefore, this gene was not specific to the gonadotroph subtype in the present study. *SF-1* is a transcription factor belonging to the steroid receptor superfamily. This transcription factor is expressed in human pituitary cells, where it regulates gonadotropin production, specifically the gonadotropin β -subunit one [13]. Indeed, it has been reported that human TTs that produce the α but not the β -subunit do not express *SF-1* [14]. In our series, only one TT (7.14%) expressed *SF-1*, and none produced the SF-1 protein. However, 36.62% of all GTs, and 94.74% of the subset, expressed *SF-1* and the SF-1 protein, respectively. Since we used the hydrolysis probe with the best coverage, the discrepancy between gene and protein expressions could be attributed to other factors such as the possible influence of miRNAs that might affect protein expression.. On the other hand, the stability of the SF-1 mRNA may have influenced its detection.

At the same time, 87.32% of GTs expressed *GATA2*, a zinc finger transcription factor involved in the development of gonadotroph cells. In a previous study, *GATA2* was detected by IHC and RT-PCR in 100% of the gonadotropin-subunit positive tumors [15]. Thus, this transcription factor could be considered a marker of GTs, underlining its utility in the correct diagnosis of the gonadotroph lineage of most of our previously identified GTs. Interestingly, 20.45% of the CTs of our series also

expressed *GATA2*, and, contrarily, 74.65% of the GTs expressed *NEUROD1*. The co-expression of *GATA2* in CTs and *NEUROD1* in GTs suggests that some of our CTs and GTs could represent the cortico-gonadotroph tumor subtype previously suggested by Cooper et al. [16]. This subtype behaves as an entity with cellular characteristics of both gonadotroph and corticotroph tumors, expressing *NEUROD1* and SF-1 but little or no Tpit. All tumors are macroadenomas and clinically behave similarly to silent CTs. In addition, 50% of TTs also expressed *GATA2*. Besides its participation in the differentiation of gonadotrophs, *GATA2* also participates in the activation of the thyrotropin-subunit promoter [17,18]. Indeed, data have shown that *GATA2* is detected in the gonadotropin-subunit positive tumors and in most TTs [15]. These results suggest that the interaction between *GATA2* and Pit-1 could promote the differentiation of TTs.

As expected, STs, LTs, and TTs preferentially expressed the transcription factor Pit-1, both gene and protein. Pit-1 (*PIT-1*) is part of the homeobox family of proteins involved in the cellular development. This transcription factor actively participates in the cell proliferation and hormonal activity of the pituitary, stimulating the *GH* and *PRL* in both rodents and humans [19,20]. Moreover, it has been reported in TSH-, PRL-, and GH-secreting pituitary tumors. Unlike Pit-1 mRNA transcripts, which are found in all pituitary cells, the Pit-1 protein has only been described in thyrotroph, somatotroph, and lactotroph cells [21]. Its expression in tumors derived from other cell lineages, such as CTs, has been attributed to the presence of PRL, GH-, or TSH- β mRNA-expressing cells in these tumors [22]. This could explain the concordance of only 0.825 (Kappa coefficient) between the molecular and IHC determination of Pit-1 in our subset study. Therefore, the determination of *PIT-1* allowed us to reclassify five TTs and three LTs as other pituitary tumor subtypes. Conversely, some CTs and NC tumors were identified as Pit-1 cell lineage dependent tumors.

Fifty-four percent of LTs and 4.22% of GTs expressed the estrogen receptor 1 gene (*ESR1*), which was also found in 23.08% of UPH and 4.88% of NC tumors. However, some of our UPH tumors were *LH/FSH* positive, and most NC tumors were finally re-classified as GTs. *ESR1* mediates the mitogenic effects of estrogens on pituitary cells. Two forms with different tissue patterns of expression exist: estrogen receptor (ER) α and ER β . ER α has been limited to LTs and GTs, where it could modulate the gonadal steroid estrogen (E₂)-mediated gene expression [23]. In a previous study of 71 human PitNETs, the analysis of ER mRNA by RT-PCR showed significant expression of ER α in all LTs and 61% of GTs [24]. Simultaneously, another study evaluating the mRNA expression of ER α and ER β in 38 PitNETs found a co-expression of both receptors in 60% of LTs and 29% of GTs. Therefore, the expression of *ESR1* could be helpful in identifying tumors, especially of lactotroph but also gonadotroph lineage.

Five plurihormonal tumors (four functioning and one silent) in the whole series (2%) (Table 1) expressed a combination of *GH*, *PRL*, or *TSH*, suggesting Pit-1 lineage. In all these cases (Table 2), the study of the *PIT-1* transcription factor confirmed the diagnosis. The positive-Pit-1 tumor was previously called silent subtype 3 adenoma. Its prevalence was estimated at under 1% of all pituitary tumors, and its diagnosis was based on specific ultrastructural characteristics, including nuclear spheridia and prominent Golgi complexes in large cells with irregular nuclei [25]. Recently, a review of 29 PitNETs showed that this subtype included both functioning and silent tumors, mostly presenting TSH, GH, PRL, or ACTH immunoreactivity [26]. The behavior is considered very aggressive, prompting calls for its proper identification. The prevalence of plurihormonal Pit-1 tumors found in our molecular series is twice that published in the literature, suggesting that molecular studies could be more sensitive than IHC ones for detecting Pit-1 plurihormonal tumors. Indeed, our pathologist did not identify any plurihormonal Pit-1 positive tumors in the subset.

In our study, plurimorphous, plurihormonal tumors, which include two or more different lineages, were found in 5.6% and 12.5% (Table 4) of the tumors in the molecular and immunohistochemical analysis of transcription factors, respectively. In over 70% of the cases, the tumors were silent. The frequency of this subtype was similar when they were identified according to the molecular expression of the transcription factors (5.6%, Table 4) and the molecular expression of the pituitary-specific hormones (5.2%, Table 1). Conversely, this frequency almost quadrupled in the immunohistochemical study (12.5%, Table 4) compared with the molecular one (3.6%, Table 1). UPH tumors are PitNETs derived from two or more independent cell lineages, so they express inexplicable IHC combinations by cytodifferentiation, and their etiology is not well-known. Some authors have proposed that they could come from clonal expansions of uncommitted cells [27]. These unusual combinations have been scarcely documented, and most publications have been isolated cases or double PitNETs. Moreover, the typification of these tumors has been based on the IHC study of pituitary-specific hormones [28-32]. Only Kageyama et al [33] have described the IHC co-expression of NEUROD1, Tpit and Pit-1 in a silent PitNET with positivity for ACTH and PRL. Our results suggest that this tumor subtype is more prevalent than initially thought. Whether it behaves as aggressively as the Pit-1 subtype remains to be clarified, but this question is beyond the scope of the present study.

Like Nishioka et al [9], but using molecular studies of pituitary-specific transcription factors, we reclassified 80.5% (33/41, Supplemental Table 1) of the tumors previously deemed to be NC in the whole sample, reducing the frequency of this subtype from 16.3% to 3.2% (Tables 1 and 4). Most of the NC tumors (31/33, 94%) were re-classified as GTs (Supplemental Table 1). Similar results were found in the subset with the IHC study: the frequency of NC tumors decreased from 16.1% to 3.6% (Table 1 and 4), while 77.77% (7/9, Supplemental Table 1) of tumors previously identified as NC PitNETs were classified as GTs. NC tumors were initially defined as chromophobic tumors without signs of pituitary-specific cell differentiation by IHC or specific characteristics in the electron microscopy study [34]. The 2017 WHO classification of endocrine tumors extended the definition of NC tumors to include the lack of evidence of pituitary-specific cell line differentiation depending on the IHC positivity of pituitary-specific transcription factors. Initially, NC tumors were thought to constitute up to 30% of sPitNETs, but more advanced IHC studies [35] and the study of pituitary-specific hormones genes [6,7] drastically reduced this estimate. The IHC study of transcription factors has further reduced the percentage of NC tumors from surgical series (<5%) [9], as shown also in our study.

As other authors have found [9,35], most NC tumors in our study were re-classified as GTs. Gonadotroph and NC tumors share most characteristics in the pathological evaluation. Both are Periodic Acid Schiff (PAS)-negative chromophobic tumors and contain Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, and small and sparse secretory granules by electron microscopy. Indeed, several years ago, some studies demonstrated that NC tumors released β -LH or β -FSH in cell tissue cultures [36], and later studies detected their expression of α or β FSH mRNA or LH subunits by in situ hybridization [37,28]. Our previous studies of FSH and LH expression by RT-qPCR [6,7] and the present analysis of transcription factors of gonadotroph lineage (*SF-1*, *GATA 2* and *ESR1*) are consistent with these results. Therefore, most of the tumors initially identified as NC tumors should be considered gonadotroph PitNETs.

Overall there was acceptable concordance between the molecular and IHC identification of PitNETs based on pituitary-specific transcription factors (Table 5). As in the molecular and IHC PitNET identification based on pituitary-specific hormone gene and protein expression [6,7], the concordance was good for CTs and Pit-1 tumors but worsened in GTs and especially in UPH and NC tumors. The 2017 WHO classification of endocrine tumors continues recommending the analysis of transcription factors and pituitary hormones by IHC. However, some antibodies to transcription

factors, such as SF-1, are not readily available, and in addition, the IHC techniques require very well-trained pathologists, restricting the analysis of transcription factors to a few pathology departments. Moreover, the protein expression of a specific gene is sometimes aborted, reducing the sensitivity of the IHC in identifying the cellular origin of the tumor. Indeed, we recently reported that the molecular analysis contributes to the typification of a cystic prolactinoma whose pathological study was negative for all pituitary hormones [39]. Therefore, we believe that the molecular determination of the pituitary-specific transcription factor and hormone genes significantly complements the IHC studies, expanding the number of Pituitary Centers of Excellence that could benefit from a better typification of PitNETs.

4. Materials and Methods

To study the contribution of the analysis of gene expression of specific pituitary transcription factors to the typification of PitNET subtypes, we performed a prospective study of SF-1, GATA 2, TPIT and Pit-1 in a large series of pituitary tumors previously characterized accordingly to their expression of pituitary-specific gene hormones. In addition, we also studied the protein expression of this transcription factors (except for GATA-2) in a subset to calculate the concordance between gene and protein expression.

4.1. Patients and samples

We selected 251 tumors from our collection of PitNETs for which we have enough biological material to analyze the molecular expression or transcription factors. Anonymized clinical, immunohistochemical, and molecular data were collected from the Spanish Molecular Registry of PitNETs (REMAH) database, which is part of a Spanish multicenter project. This was a prospective study in which the RNA quantity and quality were determined using the NanoDrop Spectrophotometer.

In addition, RNA integrity was evaluated by the 4200 TapeStation system (Qiagen) in a subset of 96 samples, since we did not have enough material for many of the samples to perform this analysis in the whole series, due to the small size of this type of tumors. Briefly, 79.2% of the samples showed an RNA Integrity Number (RIN) higher than 6 compared to 15.6% of samples that showed an RIN lower than 6; 5.2% of samples could not be evaluated. The eventual bias introduced by a low-quality RNA was overcome by the use of samples that came from tissue frozen and stored in RNAlater (which prevents RNA degradation), the use of an optimized extraction kit which delivers optimal results in all downstream applications including RT-qPCR analysis, the normalization against two reference genes, a short amplicon size, and random hexamer priming.

4.2. Identification of PitNET subtypes according to their clinical behavior and the expression of pituitary-specific hormone genes

Different PitNET subtypes were identified according to the criteria previously published by our group. Briefly, functioning and silent PitNETs were determined depending on the presence of a recognizable endocrine syndrome, and different PitNET subtypes were identified according to the dominant pituitary-specific hormone gene expression.

The identification of tumor subtypes was based on the dominant gene (to define the concept of gene dominance in a specific PitNET subtype, we calculated the interquartile (p25-p75) expression of the specific genes for the corresponding, clinically identified subtype, i.e. the interquartile range of GH expression in clinically active naïve acromegalic patients) and protein expression of one or more hormones: (1) *POMC*, *AVPR1B* and *CRHR1/ACTH* for CTs; (2) *GH/GH* for STs and *GH-PRL/GH-PRL* for ST mixed or mammosomatotroph; (3) *PRL/PRL* for LTs; (4) *TSH/TSH* for TTs; (5) *FSH-LH/FSH-*

LH for GTs. Finally, when there was dominant gene or protein expression for more than one pituitary-specific hormone, we classified the tumor as UPH, and when there was no expression of the studied genes/proteins, we considered the tumor as NC. We considered as diagnostic a fold change (by RT-qPCR) of a pituitary-specific hormone gene above p25 and an immunopositivity of a pituitary-specific hormone protein of more than 5% (by IHC).

4.3. Molecular and IHC identification of PitNET subtypes according to transcription factors

In all tumors of the whole sample we analyzed the gene expression of the main transcription factors related to the three pituitary cell lineages: *TPIT*, *NEUROD1*, *PIT-1*, *ESR1*, *GATA2*, and *SF-1*. Moreover, in a subset of 56 tumors we simultaneously studied the protein expression of the corresponding transcription factors (Tpit, Pit-1 and SF-1) by IHC to calculate the concordance between molecular and immunohistochemical identification of PitNET subtypes.

The identification of tumor subtypes was based on the dominant gene and protein expression of one or more transcription factors: 1. *TPIT*/Tpit for CTs; 2. *PIT-1*/Pit-1 and *GATA2*/*ESR1* for tumors of the Pit-1 lineage; 3. *GATA2*/*SF-1*/*SF-1* for GTs. When there was dominant gene or protein expression of more than one pituitary cell lineage, we classified the tumor as UPH, and when there was no expression of the studied genes/proteins, we considered the tumor as NC. *GATA2*, *NEUROD1* and *ESR1* were not quantified by IHC. We considered as diagnostic a fold change (by RT-qPCR) of a specific transcription factor gene above p25 and an immunopositivity of a specific transcription factor protein over 5% (by IHC).

4.4 Concordance between molecular and immunohistochemical identification of PitNET subtypes according to the gene or protein expression of transcription factor

Once we identified the different PitNET subtypes according to the gene and protein expression of the transcription factors studied in the subset of 56 patients, we calculated the concordance between the molecular and immunohistochemical identification (kappa coefficient).

4.5 Discordant cases

Once we molecularly identified all cases on the basis of transcription factor's expression, we observed some discordance with respect to the pituitary-specific hormone gene identification. Specifically, 7 CTs were re-classified as GTs, UPH, and Pit-1; 5 GTs as NC and UPH; 4 STs as NC and UPH; 3 LTs as GTs and CTs; 5 TTs as UPH, GTs, NC, and CTs; 6 UPH as GTs, NC, and Pit-1; and 40 NCs as GTs, UPH and Pit-1. All these cases are summarized in Supplemental Table S1.

4.6. RNA extraction and cDNA synthesis

All molecular studies were centralized in the Alicante General University Hospital Research Institute (ISABIAL) laboratory.

All samples were preserved immediately after surgery in RNAlater solution at 4°C for 24 hours and then stored at -20°C. The biological samples were disintegrated in the TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany). We used the AllPrep DNA-RNA-Protein kit (Qiagen) for manual RNA extraction (treated with DNase) and measured RNA concentration and purity in the Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

For each retrotranscription reaction, we used 2 µg of RNA in a total volume of 20 µL, employing the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) which uses the reverse transcriptase MultiScribe™. The conditions for the thermal cycler were: 10 minutes at 25 °C, 120 minutes at 37 °C, 5 minutes at 85 °C and, finally, hold at 4 °C.

4.7. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

We performed RT-qPCR following the manufacturer's instructions in the Quant Studio 12K (Life Technologies, CA, USA), using assays based on hydrolysis probes. We selected the following assays: *TPIT* (Hs00193027_m1 and Hs.PT.58.26777525), *NEUROD1* (Hs01922995_s1 and Hs.PT.58.38524795), *PIT-1* (Hs00230821_m1 and Hs.PT.58.3315301), *GATA2* (Hs00231119_m1 and Hs.PT.58.961996), *ESR1* (Hs01046816_m1 and Hs.PT.58.14846478) and *SF-1* (Hs01124206_m1 and Hs.PT.58.4383285) *TPITPIT-1*. As endogenous controls we selected *PGK1* (Hs00943178_g1 and Hs.PT.58.27790011) and *TBP* (Hs00427620_m1 and Hs.PT.58.19489510). The total volume per reaction was 10 μ L: 5 μ L master mix, 1 μ L RT-PCR product, 0.5 μ L hydrolysis probe and 3.5 μ L nuclease-free water. The RT-qPCR conditions were: 2 minutes at 50 °C, 20 seconds at 95 °C (polymerase activation) and 40 cycles of PCR (1 second at 95 °C plus 20 seconds at 60 °C).

A pool of RNA from nine normal pituitary samples obtained from autopsies served as a calibrator. All samples were analyzed in duplicate. The relative differences in gene expression were expressed as fold change and were obtained with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (SDS software, Applied Biosystems).

4.8 IHC techniques

Fifty-six tumors previously diagnosed according to the 2004 WHO classification criteria were studied. Tissue microarrays (TMAs) were constructed with the selected cases. To do that, two 1 mm paraffin cylinders of each tumor were sampled to build a block using a matrix tissue device (Beecher instruments). Each block included 20 cases plus 2 controls. The TMAs were exposed to a panel of antibodies against the following pituitary cell lineage transcription factors: Pit1 (ThermoFisher PA5-59662), SF1 (abcam ab217317) and Tpit (abcam ab243028). The quantification of the immunostaining was performed by three observers in a Multivision microscope. The results were expressed as a percentage of immunostained cells.

4.9. Ethics

The study complies with the Declaration of Helsinki and other applicable laws and received the approval of the local ethics committee (CEIm reference number: PI2018/127, date: 08 October 2018, Alicante General University Hospital). None of the donors came from a vulnerable population, and all donors or relatives freely provided written informed consent.

4.10. Statistical analysis

Qualitative variables (including PitNET subtypes) were expressed as absolute and relative frequencies. Participants' age and tumor diameter were expressed as mean \pm standard deviation. We used the Shapiro-Wilk test to investigate normality in the distribution of the molecular variables (fold change of transcription factor genes). To compare qualitative and quantitative variables, we used the Kruskal-Wallis and Mann Whitney U test. We calculated the Cohen's kappa coefficient to measure concordance between the IHC and molecular identification of the different subtypes of PitNET ($\kappa = 1$ representing complete concordance and $\kappa \leq 0$ null concordance). We calculated the interquartile range and mean fold change to elaborate the figures; *p* values of less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed with SPSS 24.0 software (IBM Software; Miguel Hernandez University, Alicante, Spain).

5. Conclusions

The RT-qPCR of specific-pituitary transcription factor genes allows a better typification of PitNETs, significantly reducing the percentage of NC tumors, which were mostly reclassified as gonadotroph tumors. Moreover, it complements the IHC study in the proper typification of plurihormonal Pit-1 and unusual tumors and gives insights into the pathogenesis of PitNETs.

On basis of our results, we consider that whenever the IHC studies of pituitary-specific transcription factors are not available, the RT-qPCR of pituitary-specific transcription factor genes and hormones could help pathologists, endocrinologists and neurosurgeons to improve the management of patients with pituitary tumors.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/12/1990/s1>, Table S1: Demographic, clinical, biochemical, immunohistochemical, and molecular characteristics of the study series

Author Contributions: Conceptualization, A.P., A.G.M., M.E.T., C.F., R.C., and C.L.; methodology, A.G.M., M.E.T., S.S.O., S.M.L., I.A.; formal analysis, A.G.M., M.E.T., I.A., S.S.O., S.M.L., and A.P.; writing—original draft preparation, A.G.M., M.E.T., I.A., A.P.; writing—review and editing, M.E.T., A.G.M., S.S.O., S.M.L., C.F., R.S., C.L., I.A., and A.P.; supervision, A.P.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We thank J. Abarca (Neurosurgery Department, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain), I. Monjas (Otolaryngology Department, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain), P. Riesgo (Neurosurgery Department, Hospital Universitario La Ribera, Valencia, Spain), J.A. Simal (Neurosurgery Department, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain), and H. Sandoval (Neurosurgery Department, Complejo Universitario de Albacete, Albacete, Spain) for their surgical contributions. We also thank the biobanks of the Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Hospital General Universitario de Alicante, and Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

6. References

1. Osamura R.Y, Lopes M.B.S., Grossman A., Kontogeorgos G. TJ. WHO classification of tumours of the pituitary. In: Lloyd R.V., Osamura R.Y. Klöppel RJ, ed. WHO Classification of Tumours of Endocrine Glands. 4th ed. Lyon: IARC:Lyon 2017; 2017:11-63.
2. Asa SL, Casar-Borota O, Chanson P, et al. From pituitary adenoma to pituitary neuroendocrine tumor (PitNET): an International Pituitary Pathology Club proposal. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(4):C5-C8. doi:10.1530/ERC-17-0004
3. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004;101(3):613-619. doi:10.1002/cncr.20412
4. Agustsson TT, Baldvinsdottir T, Jonasson JG, et al. The epidemiology of pituitary adenomas in Iceland, 1955-2012: a nationwide population-based study. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(5):655-664. doi:10.1530/EJE-15-0189
5. Drummond J, Roncaroli F, Grossman AB, Korbonits M, Arta Korbonits M'. Clinical and Pathological Aspects of Silent Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(7):2473-2489. doi:10.1210/jc.2018-00688

6. Sanchez-Tejada L, Sanchez-Ortiga R, Lamas C, et al. Contribution of molecular analysis to the typification of the non-functioning pituitary adenomas. Luque RM, ed. PLoS One. 2017;12(7):e0180039. doi:10.1371/journal.pone.0180039
7. García-Martínez A, Sottile J, Fajardo C, et al. Is it time to consider the expression of specific-pituitary hormone genes when typifying pituitary tumours? Luque RM, ed. PLoS One. 2018;13(7):e0198877. doi:10.1371/journal.pone.0198877
8. Al-Shraim M, Asa SL. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: What is new? Acta Neuropathol. 2006;111(1):1-7. doi:10.1007/s00401-005-1093-6
9. Nishioka H, Inoshita N, Mete O, et al. The Complementary Role of Transcription Factors in the Accurate Diagnosis of Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. Endocr Pathol. 2015;26(4):349-355. doi:10.1007/s12022-015-9398-z
10. Poulin G, Turgeon B, Drouin J. NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. Mol Cell Biol. 1997;17(11):6673-6682. doi:10.1128/MCB.17.11.6673
11. Lamolet B, Pulichino A-M, Lamonerie T, et al. A Pituitary Cell-Restricted T Box Factor, Tpit, Activates POMC Transcription in Cooperation with Pitx Homeoproteins. Cell. 2001;104(6):849-859. doi:10.1016/S0092-8674(01)00282-3
12. Vallette-Kasic S, Figarella-Branger D, Grino M, et al. Differential Regulation of Proopiomelanocortin and Pituitary-Restricted Transcription Factor (TPIT), a New Marker of Normal and Adenomatous Human Corticotrophs. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(7):3050-3056. doi:10.1210/jc.2002-021934
13. Asa SL, Bamberger AM, Cao B, Wong M, Parker KL, Ezzat S. The transcription activator steroidogenic factor-1 is preferentially expressed in the human pituitary gonadotroph. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81(6):2165-2170. doi:10.1210/jcem.81.6.8964846
14. Ikuyama S, Ohe K, Sakai Y, et al. Follicle stimulating hormone-beta subunit gene is expressed in parallel with a transcription factor Ad4BP/SF-1 in human pituitary adenomas. Clin Endocrinol (Oxf). 1996;45(2):187-193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8881451>. Accessed July 18, 2019.
15. Umeoka K, Sanno N, Osamura RY, Teramoto A. Expression of GATA-2 in Human Pituitary Adenomas. Mod Pathol. 2002;15(1):11-17. doi:10.1038/modpathol.3880484
16. Cooper O, Ben-Shlomo A, Bonert V, Bannykh S, Mirocha J, Melmed S. Silent Corticogonadotroph Adenomas: Clinical and Cellular Characteristics and Long-Term Outcomes. Horm Cancer. 2010;1(2):80-92. doi:10.1007/s12672-010-0014-x
17. Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, et al. Reciprocal Interactions of Pit1 and GATA2 Mediate Signaling Gradient-Induced Determination of Pituitary Cell Types. Cell. 1999;97(5):587-598. doi:10.1016/S0092-8674(00)80770-9

18. Gordon DF, Lewis SR, Haugen BR, et al. Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter. *J Biol Chem.* 1997;272(39):24339-24347. doi:10.1074/jbc.272.39.24339
19. Radovick S, Nations M, Du Y, Berg LA, Weintraub BD, Wondisford FE. A Mutation in the POU-Homeodomain of Pit-1 Responsible for Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Science (80-).* 1992;257(5073):1115-1118. doi:10.1126/science.257.5073.1115
20. Rosenfeld MG. POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev.* 1991;5(6):897-907. doi:10.1101/gad.5.6.897
21. Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, et al. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev.* 1990;4(5):695-711. doi:10.1101/gad.4.5.695
22. Yamada S, Takahashi M, Hara M, et al. Pit-1 gene expression in human pituitary adenomas using the reverse transcription polymerase chain reaction method. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;45(3):263-272. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8949563>. Accessed July 18, 2019.
23. Chaidarun SS, Swearingen B, Alexander JM. Differential expression of estrogen receptor-beta (ER beta) in human pituitary tumors: functional interactions with ER alpha and a tumor-specific splice variant. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(9):3308-3315. doi:10.1210/jcem.83.9.5128
24. Shupnik MA, Pitt LK, Soh AY, Anderson A, Lopes MB, Laws ER. Selective Expression of Estrogen Receptor α and β Isoforms in Human Pituitary Tumors 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(11):3965-3972. doi:10.1210/jcem.83.11.5236
25. Horvath E, Kovacs K, Smyth HS, et al. A novel type of pituitary adenoma: morphological features and clinical correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;66(6):1111-1118. doi:10.1210/jcem-66-6-1111
26. Erickson D, Scheithauer B, Atkinson J, et al. Silent subtype 3 pituitary adenoma: a clinicopathologic analysis of the Mayo Clinic experience. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;71(1):92-99. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03514.x
27. Kontogeorgos G, Scheithauer BW, Kovacs K, et al. Double Adenomas of the Pituitary. *Neurosurgery.* 1992;31(5):840-853. doi:10.1227/00006123-199211000-00003
28. Mazarakis N, Kontogeorgos G, Kovacs K, Horvath E, Borboli N, Piaditis G. Composite somatotroph--ACTH-immunoreactive pituitary adenoma with transformation of hyperplasia to adenoma. *Pituitary.* 2001;4(4):215-221. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12501971>. Accessed August 19, 2019.
29. Rajendran R, Naik S, Sandeman DD, Nasruddin AB. Pasireotide therapy in a rare and unusual case of plurihormonal pituitary macroadenoma. *Endocrinol diabetes Metab case reports.* 2013;2013:130026. doi:10.1530/EDM-13-0026

30. Eytan S, Kim K-Y, Bleich D, Raghuwanshi M, Eloy JA, Liu JK. Isolated double pituitary adenomas: A silent corticotroph adenoma and a microprolactinoma. *J Clin Neurosci*. 2015;22(10):1676-1678. doi:10.1016/j.jocn.2015.03.040
31. Meij BP, Lopes MB, Vance ML, Thorner MO, Laws ER. Double pituitary lesions in three patients with Cushing's disease. *Pituitary*. 2000;3(3):159-168. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11383480>. Accessed August 19, 2019.
32. Villa A, Cervasio M, Del Basso De Caro M, Cavallo LM. A rare case of ACTH-LH plurihormonal pituitary adenoma: letter to the editor. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014;156(7):1389-1391. doi:10.1007/s00701-014-2027-7
33. Kageyama K, Ikeda H, Nigawara T, Sakihara S, Suda T. Expression of Adrenocorticotrophic Hormone, Prolactin and Transcriptional Factors in Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenoma. *Endocr J*. 2007;54(6):961-968. doi:10.1507/endocrj.K07E-030
34. Kovacs K, Horvath E, Ryan N, Ezrin C. Null cell adenoma of the human pituitary. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1980;387(2):165-174. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7456308>. Accessed August 15, 2019.
35. Kontogeorgos G, Thodou E. The gonadotroph origin of null cell adenomas. *Hormones*. 2016;15(2):243-247. doi:10.14310/horm.2002.1652
36. Asa SL, Gerrie BM, Singer W, Horvath E, Kovacs K, Smyth HS. Gonadotropin secretion in vitro by human pituitary null cell adenomas and oncocytomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;62(5):1011-1019. doi:10.1210/jcem-62-5-1011
37. Böz E, Saeger W, Uhlig H, Fehr S, Lüdecke DK. HGH, PRL and beta HCG/beta LH gene expression in clinically inactive pituitary adenomas detected by in situ hybridization. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1991;418(5):405-410. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1709764>. Accessed August 18, 2019.
38. Schmid M, Münscher A, Saeger W, Schreiber S, Lüdecke DK. Pituitary hormone mRNA in null cell adenomas and oncocytomas by in situ hybridization comparison with immunohistochemical and clinical data. *Pathol Res Pract*. 2001;197(10):663-669. doi:10.1078/0344-0338-00143
39. Miralles Moragrega R, García-Martínez A, Picó A, Aranda I, Argente Villaplana CR. Can the molecular typing of the specific adenohipofyseal hormone genes be useful in the management of pituitary neuroendocrine tumours? *Endocrinol Diabetes y Nutr*. 2019;66(6):395-397. doi:10.1016/j.endinu.2019.01.003

ARTÍCULO 2

J Endocrinol Invest (2021). <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01468-2>.

The silent variants of pituitary tumors: demographic, radiological and molecular characteristics.

María Eugenia Torregrosa-Quesada¹, Araceli García-Martínez², Ángel Sánchez-Barbie³, Sandra Silva-Ortega⁴, Rosa Cámara⁵, Carmen Fajardo⁶, Cristina Lamas⁷, Ignacio Aranda⁴, Antonio Picó^{8*}

¹Department of Biochemical Analysis, Alicante General University Hospital-Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL), 03010 Alicante, Spain

²Research Laboratory, Alicante General University Hospital- ISABIAL, 03010 Alicante, Spain

³Centro de Investigación Operacional (CIO), Miguel Hernández University, 03010 Alicante, Spain

⁴Department of Pathology, Alicante General University Hospital -ISABIAL, 03010 Alicante, Spain

⁵Department of Endocrinology & Nutrition, Polytechnic University Hospital La Fe, 46026 Valencia, Spain

⁶Department of Endocrinology & Nutrition, Hospital La Ribera, Alzira, 46600 Valencia, Spain

⁷Department of Endocrinology & Nutrition, Albacete General University Hospital, 02006 Albacete, Spain

⁸Department of Endocrinology & Nutrition, Alicante General University Hospital, Miguel Hernández University, 03010 Alicante, Spain

*Correspondence: antonio.pico@umh.es

Abstract:

Tumors of the anterior pituitary gland (PTs) are mostly benign tumors with a low prevalence, which has nevertheless increased with advances in brain radiology techniques. Nearly half of PTs are not associated with a clinical endocrine syndrome. These tumors have been indistinctly named non-functioning pituitary adenomas (NFPAs) or silent pituitary tumors (SPTs) and the mechanisms of silencing are not fully known. Therefore, the aims of the present study were to study the frequency and characterize the silent variant of PTs in a large local series, and to assess their pituitary adenohypophyseal gene expression. This observational, cross-sectional study was performed in a Pituitary Tumor Center of Excellence and involved 268 PTs. After identifying the different subtypes according to the immunohistochemical (IHC) expression of adenohypophyseal hormones, we studied their gene expression by RT-qPCR. We found that silent tumors were larger and more invasive, but not more proliferative than their functioning counterparts. The RT-qPCR complements the IHC typification of PTs, reducing the proportion of null-cell subtype. Finally, some silent PT subtype variants showed lower specific adenohypophyseal hormone gene expression than their functioning counterparts, which may contribute to the absence of endocrine manifestations.

Keywords: Pituitary tumors; non-functioning pituitary adenomas (NFPA); silent pituitary tumors (SPTs); adenohypophyseal hormone gene expression

1. Introduction

The prevalence of pituitary tumors (PTs) has increased with the use of highly sensitive brain imaging techniques. Recent studies have estimated prevalence to be around 1 per 1000 population. Historically, most PTs were diagnosed as prolactin-producing tumors. However, important advances in brain imaging techniques have changed this profile, and now non-functioning PTs have emerged as the most prevalent ones, both in surgical and non-surgical series [1]. The term non-functioning pituitary adenoma (NFPA) has been widely used in the literature. NFPAs are benign adenohypophyseal tumors not associated with a clinical endocrine syndrome. The acronym has usually been related with gonadotroph and null-cell (NC) tumors. But most series include other tumor subtypes, such as silent corticotropinomas and other silent subtypes, under the NFPA umbrella [2]. Altogether, different series estimate that NFPAs represent 20% to 50% of pituitary tumors [2-5], of which 5% to 30% have typically been considered null cell tumors (NCTs) [6].

The identification of the specific pituitary-cell lineage of the NFPAs is very important because the behavior of silent corticotroph tumors (CTs) can be different than that of silent gonadotroph tumors (GTs) [7-9]. In this way it is expected that the incorporation of the analysis of pituitary-cell lineage transcription factors to the IHC study of PTs, according to the recommendations laid out in the World Health Organization's (WHO) Classification of Pituitary Tumors [10], will allow a better typification of NFPAs. Furthermore, previous results of our research group demonstrated that the molecular study of the gene expression of the adenohypophyseal hormones complements the IHC ones, allowing a more accurate identification of NFPAs [11, 12].

The silencing mechanisms of PTs are not fully understood. While there are plenty of theories on silent corticotroph tumors (S-CTs) [13-19], the information for other PTs subtypes is scarce. To date, no study has explored the hypothesis that low gene expression of pituitary hormones could be related to the absence of hormonal hypersecretion in PTs. Therefore, the aims of the present study were to calculate the prevalence of the PTs subtypes in a large sample of 268 pituitary tumors, according to the protein (IHC) or gene expression (RT-qPCR) of adenohypophyseal hormones. In addition, to analyze the demographic, clinical, radiological and molecular differences between the functioning and silent counterparts PTs subtypes.

2. Materials and Methods

The study was conducted in a Pituitary Tumor Center of Excellence and in the Research Laboratory of the Institute for Health and Biomedical Research of the Alicante General University Hospital-University Miguel Hernández. This study complies with the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee (Ref.CEIm:PI2018/127 Ref.ISABIAL: 180361). All patients signed their informed consent.

Samples

We selected 268 PTs with clinical, biochemical, radiological, IHC, and molecular information from the pituitary tumor collection of the Alicante General University Hospital biobank (Supplemental Table 1). PTs in this collection come from four university hospitals within the Spanish Molecular Registry of Pituitary Adenomas (REMAH) network: Alicante General University Hospital, University Hospital La Ribera, Polytechnic University Hospital La Fe, and the University of Albacete Hospital Complex.

PTs subtypes were identified based on the IHC expression of pituitary-specific hormones, following the recommendations of the 2017 WHO classification of tumors, but without taking into account the pituitary-lineage transcription factors [20].

Demographic, clinical, hormonal, and radiological variables

Demographic, clinical, hormonal and radiological information of the patients were anonymously collected from the REMAH 2.0 and local databases. Variables were categorized depending on whether or not PTs were functioning or silent.

Serum prolactin (PRL), cortisol, thyroid-stimulating hormone (TSH), and free thyroxine (FT4) were quantified by electrochemiluminescence immunoassay using a Cobas 801 automated autoanalyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) was measured in plasma on the same analyzer. Growth hormone (GH) was measured using the Immulite analyzer (Siemens Diagnostics; Marburg, Germany; Siemens Medical Solutions Diagnostics Limited, Glyn Rhonwy, Llanberis, UK) and IGF-1 on the Liaison analyzer (DiaSorin, Inc, Stillwater, MN, USA), both by chemiluminescent immunoassay.

Tumor size was defined by the maximum tumor diameter observed on magnetic resonance imaging [21]. Invasiveness was graded according to the Knosp grades (invasive tumors: grades III–IV; non-invasive tumors: grades I–II) [22].

Immunohistochemical studies

IHC studies were carried out in the pathology departments of the four participating reference hospitals. Formalin-fixed paraffin-embedded tissue was used with standard automated techniques in the Autostainer Link48 (Dako-Agilent) with the Envision (Dako) high-sensitivity visualization system. Samples of 2 mm paraffin cylinders were taken from each tumor to build a block using a matrix tissue device (Beecher instruments). Each block included 20 cases plus 2 controls.

Immunostaining was performed against the following pituitary hormones: GH, PRL, ACTH, follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), TSH and alpha subunit. Immunostaining was detected using the Envision kit in an automatic immunostainer. PTs were scored based on the percentage of immunoreactivity of positive cells ($3 \geq 67\%$; $2 = 34\text{--}66\%$; $1 = 5\text{--}33\%$; $0 = 0\text{--}4\%$) or semi-quantitatively ($3 = +++$, $2 = ++$, $1 = +$, $0 = 0$).

Cell proliferation was estimated by IHC of the MIB1-LI/Ki-67 staining index. Ki-67 quantification was carried out on hot spots in complete sections. At least 500 cells were quantified at each point, considering any intensity of nuclear staining positive. The result was expressed as a percentage, with Ki67 of more than 3% defined as high proliferation [23].

Molecular studies

Molecular studies were centralized in the Alicante General University Hospital-Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL) Research Laboratory. All 268 samples were preserved immediately after surgery in RNAlater solution at 4°C for 24 hours and then stored at –20°C. The biological samples were disintegrated in the TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany). We used the AllPrep DNA-RNA-Protein kit (Qiagen) for manual RNA extraction and measured their concentration and purity in the Nanodrop spectrophotometer (Thermo 465 Scientific, Waltham, MA, USA). For each retrotranscription reaction, we used 2 µg of RNA in a total volume of 20 µL, employing the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems).

We performed RT-qPCR following the manufacturer's instructions in the 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, CA, USA) using: SYBR Green primers in 133 tumors [12], and TaqMan Fast Advanced PCR Master Mix and assays based on hydrolysis probes (TaqMan Gene Expression Assays, Life Technologies) in the remaining 135 tumors [11]. The use of two methods did not affect the study since they have both shown good correlation with clinical diagnosis[11]. Specifically, gene

expression levels of all pituitary hormones, type 1 corticotrophin-releasing hormone receptor (*CRHR1*) and arginine vasopressin receptor 1b (*AVPR1B*) were measured.

A pool of RNA from nine normal pituitary samples obtained from autopsies served as a calibrator. All samples were analyzed in duplicate. The relative differences in gene expression were expressed as fold change (FC) and were obtained with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (SDS software, Applied Biosystems).

Statistical analysis

Qualitative variables, including PTs subtypes, were expressed as absolute and relative frequencies. Participant age was expressed as mean \pm standard deviation (SD). The Shapiro-Wilk test was used to determine the normality of the distribution of the quantitative variables. Associations between demographic variables (age, sex) and clinical variables (functioning tumor vs. silent tumor) with molecular variables (FC) were analyzed by the student t, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, or Chi squared tests, as appropriate. P values of less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed with the SPSS 15.0 software (IBM Software, Armonk, NY, USA).

3. Results

Demographic, clinical and radiological characteristics of the overall sample (n=268)

Most patients (95.5%) were aged older than 25 years (mean 49.74 ± 15.37), 51.9% were women, and 89.6% were macroadenomas, of which 56.3% were invasive. One hundred sixty-one (60.1%) tumors were silent, including all GT and NCT.

Distribution of PTs subtypes in the whole series, by their IHC or pituitary-hormone gene expression

Table 1 shows the distribution of the 268 PTs of the series along with the functioning and silent variants of the different subtypes, according to IHC or molecular identification. The frequency of the different subtypes changed depending on the method of identification. The most important differences between IHC and molecular identification were observed in NCTs and GTs.

Table 1. IHC and molecular characterization of PTs subtypes of the series, according to their clinical diagnosis.

Clinical diagnosis	n	IHC subtype	Molecular subtype
Acromegaly	68	35 ST	42 ST
		28 ST MIXED	7 ST MIXED
		3 PH	13 PH
		2 NCT	2 NCT
			2 TT
			1 GT
			1 LT
Cushing	28	11 CT	23 CT
		2 NCT	4 PH
		14 PH	1 NCT
		1 ST	
Hyperprolactinemia	12	11 LT	8 LT
		1 ST MIXED	1 CT
			3 NCT
Hyperthyroidism	3	1 TT	3 TT
		1 ST	
		1 ST MIXED	
Non-functioning	157	56 NCT	30 NCT
		40 GT	80 GT
		14 CT	20 CT
		9 LT	6 LT
		17 PH	10 PH
		8 ST	2 ST MIXED
		10 ST MIXED	9 TT
		3 TT	
TOTAL	268	268	268

PT, pituitary tumor; IHC, immunohistochemistry; F-, functioning; S-, silent; ST, somatotroph tumor; ST Mixed, somatotroph-lactotroph tumor; CT, corticotroph tumor; LT, lactotroph tumor; TT, thyrotroph tumor; GT, gonadotroph tumor; PH, plurihormonal; NCT, null cell tumor.

Demographic, clinical, and radiological differences between functioning and silent PTs subtypes according to IHC identification

Table 2 presents the prevalence of the different subtypes in the whole sample, the functioning and silent counterparts within them, and their demographic, biochemical, and radiological characteristics. Silent tumors, as a whole, were larger (26.65 ± 9.76 mm vs 17.2 ± 10.20 mm, $p < 0.001$) and more invasive (65.8% vs 40.2% , $p < 0.001$) than functioning ones. Moreover, most (61.7%) were found in men, and they were diagnosed later in life than their functioning counterparts (54.71 ± 14.84 years vs 42.25 ± 12.98 years; $p < 0.001$).

Table 2. Clinical, pathological and radiological differences between functioning and silent PTs subtypes according to their IHC identification

Subtype	Total n (%)	Functioning n (%)	Silent n (%)	p-value
ST, n (%)	45 (16.79)	37 (82.22)	8 (17.78)*	
Age, years, mean ± SD	44.67 ± 12.76	44.14 ± 12.96	47.3 ± 12.28	0.63
Women, n (%)	28 (62.22)	25 (89.3)	3 (10.7)	0.12
Macro, n (%)	43 (95.55)	35 (94.6)	8 (100)	0.37
Tumor diameter, mm, mean ± SD	19.6 ± 9.65	18.81 ± 9.41	23.25 ± 10.54 ^a	0.18
Invasive, n (%)	21 (46.67) ^b	16 (43.2)	5 (62.5)	0.32
Proliferative, n (%)	5 (11.1%)	5 (13.5 %)	0 (0 %)	na
GH, ng/mL, (n) mean ± SD		(33) 20.78 ± 24.16	(5) 2.36 ± 2.73	0.009
IGF-1, ng/mL, (n) mean ± SD		(36) 864.29 ± 361.69	(6) 204.17 ± 135.19	0.001
Mixed ST, n (%)	40 (14.92)	30 (75)	10 (25)	
Age, years, mean ± SD	45.80 ± 11.02	45.17 ± 10.39	47.7 ± 13.14	0.77
Women, n (%)	20 (50)	16 (80)	4 (20)	0.46
Macro, n (%)	33 (82.5)	24 (80.0)	9 (90.0)	0.45
Tumor diameter, mm, mean ± SD	17.79 ± 9.17	16.0 ± 8.41	22.8 ± 9.81 ^a	0.045
Invasive, n (%)	18 (45) ^b	12 (40.0)	6 (60.0)	0.27
Proliferative, n (%)	4 (10)	3(10)	1(10)	na
GH, ng/mL, (n) mean ± SD		(24) 22.56 ± 36.58	(8) 0.244 ± 0.13	<0.001
IGF-1, ng/mL, (n) mean ± SD		(25) 879.52 ± 431.67	(8) 136.95 ± 60.036	<0.001
PRL, ng/mL, (n) mean ± SD		(23) 161.29 ± 463.52	(9) 35.88 ± 31.57	0.867
CT, n (%)*	25 (9.32)	11 (44)	14 (56)**	
Age, years, mean ± SD	41.52 ± 13.25	40.27 ± 10.98	42.5 ± 15.13	0.76
Women, n (%)	13 (52)	7 (53.8)	6 (46.2)	0.30
Macro, n (%)	19 (76)	5 (45.4)	14 (100)	<0.001
Tumor diameter, mm, mean ± SD	20.67 ± 13.25	13.55 ± 9.83	26.69 ± 13.57 ^c	0.016
Invasive, n (%)	10 (40)	4 (36.4)	6 (42.9)	0.49
Proliferative, n (%)	3 (12)	1 (9 %)	2 (14.2)	na
Serum cortisol, µg/dL, (n) mean ± SD		(11) 23.62 ± 11.99	(10) 18.95 ± 12.32	0.39
ACTH, pg/mL, (n) mean ± SD		(11) 98.49 ± 60.83	(7) 103.23 ± 83.76	0.751
LT, n (%)	20 (7.46)	11 (55)	9 (45)	
Age, years, mean ± SD	48.25 ± 22.92	35 ± 20.61	64.44 ± 13.42	0.007
Women, n (%)	8 (40)	3 (37.5)	5 (62.5)	0.20
Macro, n (%)	19 (95)	10 (90.9)	9 (100)	0.27
Tumor diameter, mm, mean ± SD	27.95 ± 12.03	26.45 ± 14.90	29.78 ± 7.71	0.22
Invasive, n (%)	13 (65)	7 (63.6)	6 (66.7)	0.89
Proliferative, n (%)	3 (15)	2(18.2)	1 (11.1)	na
PRL, ng/mL (n) mean ± SD		(10) 2379.34 ± 4965.71	(9) 49.90 ± 42.66	0.022
TT, n (%)	4 (1.49)	1 (25)	3 (75)	
Age, years, mean ± SD	51.25 ± 16.03	40	55 ± 17.35	0.35
Women, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	na
Macro, n (%)	4 (100)	1 (100)	3 (100)	na
Tumor diameter, mm, mean ± SD	26.75 ± 17.84	10 ± 0	32.33 ± 17.04	0.18

Invasive, n (%)	1 (25)	0 (0)	1 (33.3)	0.41
Proliferative, n (%)	1 (25)	0 (0)	1 (33.3)	na
TSH, mU/L (n) mean ± SD		(1) 2.40	(2) 2.17 ± 2.651	na
FT4, ng/dL (n) mean ± SD		(1) 2.84	(2) 0.75 ± 0.353	na
PH, n (%)	34 (12.68)	17(50)	17(50)	
Age, years, mean ± SD	48.00 ± 16.18	39.12 ± 11.33	56.88 ± 15.63	0.001
Women, n (%)	26 (76.47)	15 (57.69)	11 (42.31)	0.10
Macro, n (%)	24 (70.58)	8 (47.1)	16 (94.1)	0.001
Tumor diameter, mm, mean ± SD	18.75 ± 11.21	12.19 ± 7.06	25.31 ± 10.88	0.001
Invasive, n (%)	14 (41.17)	4 (28.57)	10 (71.43)	0.034
Proliferative, n (%)	4 (11.7)	3 (17.6)	1 (5.8)	na
GT, n (%)	40 (14.92)	0 (0)	40 (100)	
Age, years, mean ± SD	54.75 ± 14.51		54.75 ± 14.51	na
Women, n (%)	17 (42.5)		17 (42.5)	na
Macro, n (%)	40 (100)		40 (100)	na
Tumor diameter, mm, mean ± SD	26.92 ± 8.02		26.92 ± 8.02 ^c	na
Invasive, n (%)	29 (72.5)		29 (72.5)	na
Proliferative, n (%)	3 (7.5)		3 (7.5)	na
NCT, n (%)	60 (22.39)	0 (0)	60 (100)	
Age, years, mean ± SD	57.63 ± 13.66		57.63 ± 13.66	na
Women, n (%)	27 (45)		27 (45)	na
Macro, n (%)	58 (96.7)		58 (96.7)	na
Tumor diameter, mm, mean ± SD	27.19 ± 9.49		27.19 ± 9.49	na
Invasive, n (%)	44 (73.3)		44 (73.3)	na
Proliferative, n (%)	5 (8.3)	0	5 (8.3)	
TOTAL	268 (100%)	107 (39.92%)	161 (60.07%)	
Tumor diameter, mm, mean ± SD	22.86 ± 10.95	17.20 ± 10.20	26.65 ± 9.76	0.001
Invasive, n (%)	149 (55.6)	43 (40.2)	106 (65.8)	<0.001
Proliferative, n (%)	28 (10.4)	14 (13.1)	14 (8.7)	0.25

ST, somatotroph tumor; ST Mixed, somatotroph-lactotroph tumor; CT, corticotroph tumor; LT, lactotroph tumor; TT, thyrotroph tumor; PH, plurihormonal; GT, gonadotroph tumor; NCT, null cell tumor; SD: standard deviation; a, $p=0.894$; b, $p=0.878$; c, $p=0.335$; na, not applicable. * Two acromegaly were diagnosed as silent because the IHC was NCT; two Cushing were diagnosed as silent because the IHC was NCT; these 4 NCT explain the differences in NCT between table 1 and table 2.

Adenohypophyseal hormone gene expression in silent versus functioning variants of PTs subtypes, as identified by IHC

Figure 1 shows the differences in the pituitary hormone gene expression between the different PTs subtypes. In short, pure and mixed STs and LTs expressed more *GH* and *PRL*, respectively, than their silent counterparts. In contrast, there were no significant differences in the expression of *POMC*, *CHRH* and *AVPR1B* between functioning and silent CTs. Functioning plurihormonal tumors (FPH), as a whole, showed higher expression of *PRL*, *POMC* and *AVPR1* and lower expression of *FSH* than their silent counterparts, regardless of whether they were PH-Pit 1 or PH-unusual.

4. Discussion

This study aimed to properly identify the silent counterparts of a large series of PTs subtypes and assess the differences with the functioning ones. The main strengths of the research are the large number of tumors studied and the molecular analyses performed. The most relevant limitation is that the tumors came from four different hospitals, and, unlike the RT-qPCR, the IHC procedures were not centralized.

Definition of non-functioning PTs

An important percentage of PTs do not present a recognizable endocrine syndrome and are only diagnosed due to their neuroophthalmological manifestations or incidentally during the performance of a brain imaging technique. In a recently published and very large series of 1055 pituitary tumors, 48.2% of the global series demonstrated this behavior [24], compared to 60.1% in ours. Traditionally, these tumors have been known as NFPA, but specialists increasingly prefer the term silent pituitary tumor (SPT) [2] to define pituitary tumors that express some adenohypophyseal hormones or their transcription factors on IHC but do not secrete clinically relevant hormones [2,25]. This overlapping terminology generates confusion and complicates comparisons between series. Therefore, we agree with these authors that the term NFPA should be substituted by the more specific SPT following surgery and once the immunohistochemical study is available.

Typification of PTs subtypes

The principal challenge in the identification of non-functioning PTs subtypes has been the limited accuracy of IHC in characterizing the expression of adenohypophyseal hormones, with the main surgical series reporting a high percentage of apparently NCTs [6,26]. In the present study, the percentage of non-functioning PTs largely depended on the technique used to identify them. Strikingly, the percentage of NCTs dropped from 21% (56/268) to 11.2% (30/268) and the GTs increased from 14.9% (40/268) to 29.8% (80/268) by IHC and by RT- qPCR respectively, (Table 1).

Fortunately, the introduction of the measurement of PTF of pituitary cell lineage, according to the WHO 2017 recommendations [27], has allowed a better typification of non-functioning PTs. Indeed the number of NCTs has decreased and the number of GTs and S-CTs has increased in the main series published [28,24]. Nishioka et al. reclassified 119 IHC NCTs (out of 516 consecutive NFPA) as gonadotroph (SF-1 positive; 66.4%), corticotroph (Tpit positive; 26.9 %) or Pit-1 positive (6.7%) tumors and 5% of NCTs [28]. And in Mete's study [24] the percentage of NCTs were only the 4.5%, while GTs represented 42.5% of the whole serie. Other authors have found similar results [29]. These figures matched better with our RT-q-PCR identification of non-functiony PTs (50.9% of GTs and 11.1% of NCTs) than with the IHC ones (25.5% of GTs and 35.6% of NCTs) (Table 1). In addition, the analysis of transcription factors in our series by RT-qPCR and by IHC in a subgroup of 56 tumors, reduced even more the frequency of NCTs of 3.2 % (8/251) and 3.6 % (2/56,) respectively [30]. The discrepancy between the IHC and RT-qPCR study of the adenohypophyseal hormones in the present study could be attributed to the performance of the IHC studies in four different pathology departments, in contrast to the molecular analyses, all conducted in our research laboratory; the limited sensitivity of adenohypophyseal hormone antibodies for detecting low protein expression, and the subjectivity among observers in interpreting such low values.

Characteristics of SPTs

Most silent pituitary tumores are GTs or NCTs, notwithstanding the important pool of silent tumors from other lineages. In Nishioka study, the prevalence of SPTs ranged from 9.2% of plurihormonal Pit-1 tumors to 99.3% of all gonadotropinomas and 100% of NCTs, within their respective subtypes [28]. In Mete et al.'s series, silent tumors accounted for 100% of the NCTs subtype and 99% of GTs

[24]. In our series, the prevalence of SPTs ranged from 18% of STs to 100% of GTs and NCTs of respective subtypes.

By definition, all operated silent tumors are macroadenomas. Compared with GTs, tumors from the other lineages are larger (Pit-1 lineage), more invasive (NC and CT), or present greater recurrence rates (Pit-1 and CT) [24]. Our study had a cross-sectional design, so we could not collect information about the recurrence rates of tumors during the follow-up. However, the silent tumors, as a whole, were significantly larger than the functioning ones ($p=0.001$; table 2). By subtypes, there were only significant differences in size between counterparts in the corticotroph, mixed somatotroph, and plurihormonal subtypes. Consequently, silent tumors were also more invasive than functioning ones. Among subtypes, the percentage of invasive silent tumors ranged from 42.9% of CTs to 73.3% of NCTs. Contrary to previous reports [31,24], we did not find differences in the size or invasiveness between NCTs and GTs, which is likely attributable to the fact that most NCTs in our series were GTs, as we demonstrate with the molecular study. These findings reinforce the need to properly identify the different subtypes of PTs before searching for clinical differences between them.

As a whole, PTs are low proliferative tumors. However, the WHO 2017 classification still recommends determining the Ki-67 labelling index and other proliferative indices, such as p53 or number of mitoses, depending on the former. As tumors of our series came from four different pathology departments, we only took into consideration only the Ki-67 labelling index. In contrast to Mete et al.'s results, where 60% of the series exceeded this threshold, only just 10.4% of the tumors in our series did, with no difference between functioning and silent tumors. These notable differences between the two series, one coming from a single center and the second from four centers, could be attributed to the technique's heterogeneity and the subjective interpretation of Ki-67 IHC results among observers. Therefore, we could not properly compare the differences in the proliferative behavior between functioning and silent counterparts of PTs nor among subtypes. However, the tumor subtype and its radiological extent have been considered better predictors of aggressive behavior of PTs than the Ki67 index [32,33]. The differences also highlight the importance of centralizing the analysis and treatment of pituitary pathologies in Pituitary Tumor Centers of Excellence [34].

The silencing mechanisms of PTs are not well known. The first subtype described as having a different clinicopathological reality compared with its functioning counterpart was the silent corticotroph tumor (S-CT) [14]⁴². Since then, multiple cases have been published (table 3). CTs are tumors of Tpit pituitary lineage, and they are immunopositives for ACTH and TPIT. Globally, 20% to 35% are not associated with a Cushing syndrome [35,36], and together they constitute approximately 5% of all PTs [37], although with important variability among series (table 3). Nishioka et al [28] and Mete et al [24] reported the percentage of SPTs within their histological subtype. In Nishioka et al.'s study, the prevalence of silent CTs comprised 32.9% of all corticotropinomas. In Mete et al.'s series, silent tumors accounted for 33% of CTs. The discrepancies in the prevalence of S-CTs within PTs and within tumors of corticotroph lineage have been attributed to differences in the techniques used in their identification. In our study, S-CTs constituted 56% of tumors of corticotroph lineage and 5.2% of all PTs when the subtype was identified by IHC. Contrarily to our results, S-CTs have been reported as more frequent in women, while the age of diagnosis is lower than that of other silent subtypes (table 3).

Several theories have been proposed to explain why some CTs do not cause Cushing syndrome, the most attractive of which is based on the processing of POMC and ACTH in corticotroph cells [15,16]. Indeed, by studying 24 silent and 23 functioning CTs, we recently demonstrated that the lack of secretory activity of S-CT was related to an impaired processing of POMC and a high degradation of ACTH [19]. According to this hypothesis, we did not find significant differences in the expression of *POMC*, *CHRH*, and *AVPR1B* between functioning and silent corticotroph tumors.

Table 3. Characteristics of previous case series of S-CT and other non-functioning pituitary adenomas (NFPAs)

Sample, n (%)	Gender (M/W)	P value ^a	Age, years Mean ± SD (range)	P value ^a	Size, cm Mean ± SD	p value ^a	Invasiveness Hardy grade: n (%)	p value ^a
<i>Cho et al 2010</i> [9] (162 NFPAs, all macroadenomas)								
S-CT, 28 (17%)	Ratio 1.2:1		44.5 (13-67)		2.8 ± 0.8		2: 16 (57.1) 3: 11(39.3) 4: 1 (3.6)	
Non S-CT, 134 (83%)	Ratio 1.3:1	0.042	50.2 (18-79)	0.026	3.0 ± 0.9	0.32	2: 87 (64.9) 3: 47 (35.1) 4: 0 (0)	0.077
<i>Yamada et al 2007</i> [38] (213 NFPAs)								
S-CT, 26 (12%)	4/22 (85% W)		52.1 ± 2.5 (35-72)				22 (85%)	
GT, 136 (64%)	95/41 (30% W)	<0.001	54.2 ± 1.9 (35-72)				15 (11%)	p<0.001
NC, 39 (18%)	17/22 (56% W)	0.017	51.9 ± 2.3 (32-75)				15 (38%) ^b	< 0.001
Subtype 3, 9 (4%)	6/3 (33% W)	0.007	28.3 ± 1.8 (19-34)				6 (67%) ^c	
<i>Nishioka et al 2015</i> [28] (516 NFPAs)								
S-CT, 51 (10%)	12/39 (76% W)		51 ± 13 (23-81)		Giants (> 4 cm), n (%)		23 (45.1%)	
GT, 376 (73%)	230/146 (39% W)	<0.001	56 ± 13 (18-83)	na	16 (31.4%)	na	20 (5.3%)	< 0.001
<i>Langlois et al 2017</i> [39]								
S-CT, 37 (4.5%)	17/20 (54% W)		51.1 ± 16.1		Mean ± SD		(%)	
S-ST, 17 (2.1%)	3/14 (82% W)		42.8 ± 16.3		2.53 ± 1.15		43	
GT, 70 (18.9%)	44/26 (37% W) ^d		60.0 ± 15.1		1.52 ± 0.99 (~50% macro) ^e		25	0.40
<i>Cooper et al 2010</i> [13] (109 NFPAs)								
S-CT, 25 (23%)	13/12 (48% W)		53 ± 14.3		Mean ± SD (n analyzed)		n/N analyzed (%)	
Others, 84 (77%)	55/29 (35% W)		54.9 ± 14.9	ns	3.0 ± 1.7 (n= 17)		7/17 (41%)	
<i>Jahngiri et al 2013</i> [40]								
					Mean ± SD		22/58 (38%)	ns
							n/N analyzed (%)	

S-CT, 75 (3%)	38/37 (49% W)	50 (19-83)	2.2 ± 0.9 (3% micro)	16/54 (30%)
F-CT, 134 (6%)	20/114 (85%)	39 (10-77)	0.9 ± 0.9	
Others, 1726 (91%)	836/890 (52% W)	49 (9-89)	2.0 ± 1 (13% micro)	297/1655 (18%)
<i>Alahmadi et al 2012[35]</i>				
S-CT, 20	9/11 (56% W)	51.1(24-78)	3.5 ± 2.19 (all macro)	31%
NFPA (GT+NC), 30	14/16 (53% W)	51.5	0.074	23% p=0.48
<i>Cohen-Inbar et al 2017[41] (357 NFPA)</i>				
S-CT, 50 (14%)	19:29 (40:60%)	50.9 ± 13	3.3	38 (77.6%)
Others, 307 (86%)	137:129 (52:48%)	55.2 (13.7-87)	0.06	210 (70.9%)
<i>Ioachimiscu et al 2012[42] (159 NFPA, all macroadenomas)</i>				
S-CT, 33 (21%)	19/14 (42.4% W)	49.6 ± 14.1	2.83 ± 0.97	45.5% (15)
Others, 126 (79%)	72/54 (42.9% W)	55.6 ± 12.8	0.02	30.2% (38)
<i>Torregrosa et al 2020 (161 NFPA)</i>				
S-CT, 14 (5.2%)	8/6 (46.2% W)	42.5 ± 15.13	14 (73.7%)	6 (63.6%)
F-CT, 11 (4.1%)	4/7 (53.8% W)	40.27 ± 10.98	0.76	4 (36.4%)
GT, 40 (14.9%)	23/17 (42.5% W)	54.75 ± 14.51	40 (100%)	29 (72.5%)

NFPA: non-functioning pituitary adenoma; S-CT, silent corticotroph tumor; F-CT, functioning corticotroph tumor; GT, gonadotroph tumor; NC, null cell tumor; S-ST, silent somatotroph tumor. M, men; W, women; Macro, macroadenoma (≥1 cm); Micro, microadenoma (<1 cm); na, not available; ns, not significant

^aColumn p values in comparison to S-CTs; ^bNC vs GT p<0.001; ^cSubtype 3 vs GT p<0.001; ^dS-ST vs GT p=0.002; ^eS-ST vs GT p=0.009; ^fS-ST vs GT, p>0.05

Silent somatotroph tumors (S-STs) present positive immunostaining for GH but are not associated with acromegaly. Their estimated prevalence is nearly 2% of all PTs [39,43]. In Mete et al.'s series, silent tumors accounted for 9.2% of Pit-1 lineage. In the present study, S-STs constituted 3% of all PTs and 17.7% of the IHC-diagnosed STs. The latter results were recently confirmed through the study of *PTF* gene expression [30]. As most S-STs are plurihormonal [44], the discrepancy between IHC and RT-qPCR identification of S-STs suggests an important cross-reaction between GH with α -subunit or prolactin antibodies. S-STs have been reported as more prevalent in women and are diagnosed earlier than other silent subtypes [37,44]. Accordingly, in the present series, the age at diagnosis was also lower than that of other subtypes, with the exception of S-CTs. However, we found a higher prevalence in men. Similarly to our results, it has been reported that S-STs secrete less GH than their functioning counterparts [44]. However, the silencing mechanisms of STs have yet to be clarified [25]. Several hypotheses have been raised: a low secretory activity of GH [44], a defective post-transcriptional processing of GH [45,46], or low biological activity of the secreted GH [46,47]. In this study, we found significantly lower *GH*-gene expression in silent compared to functioning STs (Fig. 1), what it is not surprising because most of silent ST are sparsely granulated tumors.

Although LTs are considered one of the most prevalent PTs subtypes, silent LTs (S-LT) have rarely been reported. Previous to surgery, they behave as NFPAs with normal or slightly elevated PRL levels, and it is difficult to differentiate the hyperprolactinemia to that related with the compression of dopaminergic pathways. Therefore, diagnosis is established only after surgery. The prevalence of LTs among silent pituitary tumors has been estimated at 0.6% to 1.65% [48,49]. In the present series, S-LTs represented 5.5% of all silent pituitary tumors and 45% of LTs. They were more prevalent in women and were diagnosed late in life (64.4 ± 13.4 years). The silencing mechanisms have not been studied. Similarly, to S-STs, pure S-LT expressed less *PRL* than F-LTs; this finding may contribute to a lower secretion of PRL. Indeed, the circulating PRL levels of S-LTs were significantly lower than those of F-LTs (table 2).

A positive PRL stain in silent tumors is frequently reported with GH-positive immunostaining, and these tumors are considered silent mixed somatotroph-lactotroph tumors. In our series, the silent mixed somatotroph-lactotroph tumors represented 6.2% of all silent PTs (Table 2) and were clearly differentiated from pure S-LTs. Silent mixed somatotroph-lactotroph tumors were more prevalent in men and were diagnosed earlier than pure LTs (47.7 ± 13.14 year). The expression of *GH* was lower than in their functioning counterparts, and again, this fact may contribute to the absence of endocrine symptoms in these tumors (figure 1).

Finally, silent TTs have also been scarcely reported. Their prevalence within tumors of thyrotroph lineage ranged from 31% to 75% in two independent series [50,51]. In our series, they comprised 1.8% of the total silent PTs and 75% of the tumors of TSH cell lineage. Because of their low number, we were unable to compare the silent and functioning variants, but the three silent TTs were macroadenomas, although only one of them was invasive.

5. Conclusions

This paper highlights the importance of identifying the silent variant of the PTs subtypes, because the behaviour of a non-functioning PTs is different depending on the lineage it derives from. Moreover, and as expected, silent tumors were larger and more invasive than their functioning counterparts. However, there was no difference in the proliferation activity between them. The molecular study of the expression of the adenohypophyseal hormone genes complements the IHC identification of the PTs subtypes, especially the NCTs ones. Moreover, the lower specific gene expression in the silent than in the functioning counterparts of some PTs subtypes, gives insights to the silencing mechanisms of PTs.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: title.

Funding: This work is funded by Novartis Oncology through the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition (SEEN). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Conflicts of interest/Competing interests: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Ethics approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Consent to participate: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Consent for publication: Samples were donated by patients to the Institutional BioBank for research purposes with the corresponding consent for publication.

Availability of data and material: All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

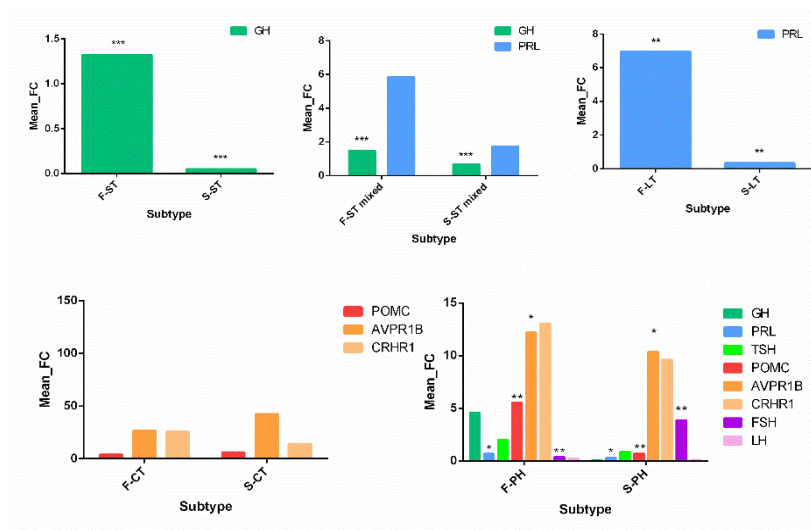
Code availability: Not applicable.

Authors' contributions: Conceptualization, M.E.T, A.G.-M. and A.P.; methodology, M.E.T, A.G.-M., S.S-O., I.A. and A.P.; validation, M.E.T, A.G.-M., S.S-O., I.A. and A.P.; formal analysis, M.E.T, A.G.-M., A.S-B. and A.P.; investigation, M.E.T, A.G.-M. and A.P.; resources, M.E.T, A.G.-M., S.S-O., I.A., R.C., C.F., C.L. and A.P.; writing—original draft preparation, M.E.T, A.G.-M. and A.P.; writing—review and editing, M.E.T, A.G.-M., A.S-B., S.S-O., I.A., R.C., C.F., C.L. and A.P.; supervision, A.G.-M and A.P.; project administration, A.G.-M. and A.P.; funding acquisition, A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments: We thank J. Abarca (Neurosurgery Department, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain), I. Monjas (Otolaryngology Department, Alicante General University Hospital, Alicante, Spain), P. Riesgo (Neurosurgery Department, University Hospital La Ribera, Valencia, Spain), J.A. Simal (Neurosurgery Department, Polytechnic University Hospital La Fe, Valencia, Spain), and H. Sandoval (Neurosurgery Department, University of Albacete Hospital Complex, Albacete, Spain) for their surgical contributions. We also thank the biobanks of the University of Albacete Hospital Complex, Alicante General University Hospital, and Polytechnic University Hospital La Fe.

Figures

Figure 1. Differences in adenohypophyseal hormone gene expression between functioning and silent variants, of PTs subtypes.



References

1. Agustsson TT, Baldvinsdottir T, Jonasson JG, et al. The epidemiology of pituitary adenomas in Iceland, 1955-2012: a nationwide population-based study. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(5):655-664. doi:10.1530/EJE-15-0189
2. Drummond J, Roncaroli F, Grossman AB, Korbonits M. Clinical and Pathological Aspects of Silent Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(7):2473-2489. doi:10.1210/jc.2018-00688
3. Tjörnstrand A, Gunnarsson K, Evert M, et al. The incidence rate of pituitary adenomas in western Sweden for the period 2001-2011. *Eur J Endocrinol.* 2014;171(4):519-526. doi:10.1530/EJE-14-0144
4. Aflorei ED, Korbonits M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 2014;117(3):379-394. doi:10.1007/s11060-013-1354-5
5. Fernandez A, Karavitaki N, Wass JAH. Prevalence of pituitary adenomas: A community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;72(3):377-382. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03667.x
6. Kontogeorgos G, Kovacs K, Horvath E, Scheithauer BW. Null cell adenomas, oncocytomas, and gonadotroph adenomas of the human pituitary: An immunocytochemical and ultrastructural analysis of 300 cases. *Endocr Pathol.* 1993;4(1):20-27. doi:10.1007/BF02914485

7. Scheithauer BW, Jaap AJ, Horvath E, et al. Clinically silent corticotroph tumors of the pituitary gland. *Neurosurgery*. 2000;47(3):723-730. doi:10.1227/00006123-200009000-00039
8. Xu Z, Ellis S, Lee CC, et al. Silent corticotroph adenomas after stereotactic radiosurgery: A case-control study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;90(4):903-910. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.07.013
9. Cho HY, Cho SW, Kim SW, Shin CS, Park KS, Kim SY. Silent corticotroph adenomas have unique recurrence characteristics compared with other nonfunctioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(5):648-653. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03673.x
10. Osamura R.Y, Lopes M.B.S., Grossman A., Kontogeorgos G. TJ. WHO classification of tumours of the pituitary. In: Lloyd R.V., Osamura R.Y. Klöppel RJ, ed. *WHO Classification of Tumours of Endocrine Glands*. 4th ed. Lyon: IARC:Lyon 2017; 2017:11-63.
11. García-Martínez A, Sottile J, Fajardo C, et al. Is it time to consider the expression of specific-pituitary hormone genes when typifying pituitary tumours? *PLoS One*. 2018;13(7). doi:10.1371/journal.pone.0198877
12. Sanchez-Tejada L, Sanchez-Ortiga R, Lamas C, et al. Contribution of molecular analysis to the typification of the non-functioning pituitary adenomas. Luque RM, ed. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180039. doi:10.1371/journal.pone.0180039
13. Cooper O, Ben-Shlomo A, Bonert V, Bannykh S, Mirocha J, Melmed S. Silent corticogonadotroph adenomas: clinical and cellular characteristics and long-term outcomes. *Horm Cancer*. 2010;1(2):80-92. doi:10.1007/s12672-010-0014-x
14. Kovacs K, Horvath E, Bayley TA, Hassaram ST, Ezrin C. Silent corticotroph cell adenoma with lysosomal accumulation and crinophagy. A distinct clinicopathologic entity. *Am J Med*. 1978;64(3):492-499. doi:10.1016/0002-9343(78)90236-X
15. Raverot G, Wierinckx A, Jouanneau E, et al. Clinical, hormonal and molecular characterization of pituitary ACTH adenomas without (silent corticotroph adenomas) and with Cushing's disease. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(1):35-43. doi:10.1530/EJE-10-0076
16. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, et al. Differential gene expression in ACTH -secreting and non-functioning pituitary tumors. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(6):717-724. doi:10.1530/EJE-07-0428
17. Tani Y, Sugiyama T, Izumiyama H, Yoshimoto T, Yamada S, Hirata Y. Differential gene expression profiles of POMC-related enzymes, transcription factors and receptors between non-pituitary and pituitary ACTH-secreting tumors. *Endocr J*. 2011;58(4):297-303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383526>. Accessed February 1, 2018.
18. Seltzer J, Ashton CE, Scotton TC, Pangal D, Carmichael JD, Zada G. Gene and protein expression in pituitary corticotroph adenomas: A systematic review of the literature. *Neurosurg Focus*. 2015;38(2). doi:10.3171/2014.10.FOCUS14683

19. García-Martínez A, Cano DA, Flores-Martínez A, et al. Why don't corticotroph tumors always produce Cushing's disease? *Eur J Endocrinol.* 2019;181(3):351-361. doi:10.1530/EJE-19-0338
20. Mete O, Lopes MB. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol.* 2017;28(3):228-243. doi:10.1007/s12022-017-9498-z
21. Imber BS, Lin AL, Zhang Z, et al. Comparison of Radiographic Approaches to Assess Treatment Response in Pituitary Adenomas: Is RECIST or RANO Good Enough? *J Endocr Soc.* 2019;3(9):1693-1706. doi:10.1210/js.2019-00130
22. Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C. Pituitary Adenomas with Invasion of the Cavernous Sinus Space. *Neurosurgery.* 1993;33(4):610-618. doi:10.1097/00006123-199310000-00008
23. Raverot G, Burman P, McCormack A, et al. European society of endocrinology clinical practice guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(1):G1-G24. doi:10.1530/EJE-17-0796
24. Mete O, Cintosun A, Pressman I, Asa SL. Epidemiology and biomarker profile of pituitary adenohypophysial tumors. *Mod Pathol.* 2018;31(6):900-909. doi:10.1038/s41379-018-0016-8
25. Cooper O, Melmed S. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: the silent tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(4):447-460. doi:10.1016/j.beem.2012.01.002
26. Kontogeorgos G, Thodou E. The Gonadotroph Origin of Null Cell Adenomas.
27. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathol.* 2017;134(4):521-535. doi:10.1007/s00401-017-1769-8
28. Nishioka H, Inoshita N, Mete O, et al. The Complementary Role of Transcription Factors in the Accurate Diagnosis of Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol.* 2015;26(4):349-355. doi:10.1007/s12022-015-9398-z
29. Manojlovic-Gacic E, Engström BE, Casar-Borota O. Histopathological classification of non-functioning pituitary neuroendocrine tumors. *Pituitary.* 2018;21(2):119-129. doi:10.1007/s11102-017-0855-1
30. Torregrosa-Quesada ME, García-Martínez A, Silva-Ortega S, et al. How Valuable Is the RT-qPCR of Pituitary-Specific Transcription Factors for Identifying Pituitary Neuroendocrine Tumor Subtypes According to the New WHO 2017 Criteria? *Cancers (Basel).* 2019;11(12):1990. doi:10.3390/cancers11121990
31. Balogun JA, Monsalves E, Juraschka K, et al. Null cell adenomas of the pituitary gland: an institutional review of their clinical imaging and behavioral characteristics. *Endocr Pathol.* 2015;26(1):63-70. doi:10.1007/s12022-014-9347-2
32. Asa SL, Ezzat S. Aggressive Pituitary Tumors or Localized Pituitary Carcinomas: Defining Pituitary Tumors. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2016;11(2):149-162. doi:10.1586/17446651.2016.1153422