



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA

**TESIS DOCTORAL:**

**IMPORTANCIA DEL PITUITARY TUMOR-TRANSFORMING GENE (PTTG) Y SU REGULACIÓN  
POR C-MYC Y E2F1 EN LA PATOGENIA DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS**

**MEMORIA DE DOCTORADO**

Ruth Sánchez Ortega

**DIRECTOR DE LA TESIS**

Antonio Picó Alfonso

Alicante 2015



D. Antonio Picó Alfonso, como Director de Tesis  
Doctoral

## CERTIFICA:

Que el trabajo "IMPORTANCIA DEL PITUITARY TUMOR-TRANSFORMING GENE (PTTG) Y SU REGULACIÓN POR C-MYC Y E2F1 EN LA PATOGENIA DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS" realizado por D<sup>a</sup> Ruth Sánchez Ortiga ha sido llevado a cabo bajo mi dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmo para los oportunos efectos en San Juan de Alicante a Veinticuatro de Julio de Dos Mil Quince.

Fdo. Dr. D. Antonio Miguel Picó Alfonso  
Director  
Tesis Doctoral



DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante  
Telf.: 96 5919449 – Fax: 96 5919450  
c.electrónico: med.psiqui@umh.es



D. JAVIER FERNANDEZ SÁNCHEZ, Director del  
Departamento de Medicina Clínica de la Universidad  
Miguel Hernández

## AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo  
"IMPORTANCIA DEL PITUITARY TUMOR-TRANSFORMING  
GENE (PTTG) Y SU REGULACIÓN POR C-MYC Y E2F1 EN LA  
PATOGENIA DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS" presentado por  
D<sup>a</sup> Ruth Sánchez Ortiga bajo la dirección del Dr. D. Antonio Picó  
Alfonso.

Lo que firmo en San Juan de Alicante a Veinticuatro de  
Julio de Dos Mil Quince.

Prof. J. Fernández  
Director  
Dpto. Medicina Clínica







A Fran y Javier

A mis padres y hermanos





## Agradecimientos

Al Dr. Antonio Picó Alfonso, sin cuyo esfuerzo, colaboración y disponibilidad no habría sido posible esta memoria.

A Laura Sánchez Tejada sin cuyo trabajo habría sido imposible llevar a cabo este trabajo de tesis doctoral y gracias a la cual he aprendido tantas cosas sobre el complejo mundo de la biología molecular.

A todos los compañeros del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital de Alicante, por la ayuda prestada en la elaboración de este trabajo y el apoyo que me han transmitido y transmiten a diario.

A mi familia, puesto que gracias a ellos he llegado hasta aquí. En especial a mi padre que fue capaz de leer la memoria completa.

A Fran por su apoyo constante y por darme el tiempo necesario para escribir esta memoria. A ti y a Javier por esas horas perdidas.

A todos aquellos que han colaborado en algún modo a la realización de este trabajo. Este trabajo ha sido financiado gracias a las becas Pfizer y Fundación para la Investigación de la HGUA.





***I. ÍNDICE***

<b>I.</b>	<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>II.1.</b>	<b>Patogenia de los adenomas hipofisarios</b> .....	<b>8</b>
<b>II.2.</b>	<b>Familia PTTG</b> .....	<b>12</b>
<b>II.3.</b>	<b>Función PTTG</b> .....	<b>13</b>
II.3.1.	Regulación del ciclo celular .....	13
II.3.2.	Securina.....	13
II.3.3.	Transactivación. Factor de Transcripción.....	13
II.3.4.	Reparación ADN.....	14
II.3.5.	Apoptosis .....	14
II.3.6.	Senescencia .....	14
<b>II.4.</b>	<b>Regulación de PTTG</b> .....	<b>15</b>
II.4.1.	Regulación de la expresión de PTTG mediante hormonas y factores de crecimiento	15
II.4.2.	Regulación de la expresión de PTTG mediante factores de transcripción.....	16
II.4.3.	Regulación de la expresión de PTTG mediante otro tipo de factores .....	16
II.4.4.	Cambios epigenéticos.....	17
II.4.5.	Fosforilación proteica.....	17
II.4.6.	Degradación .....	18
<b>II.5.</b>	<b>Papel de PTTG en la tumorigenesis</b> .....	<b>19</b>
II.5.1.	Proliferación celular.....	19
II.5.2.	Aneuploidía (e inestabilidad genética).....	19
II.5.3.	Invasión y angiogénesis .....	19
<b>II.6.</b>	<b>Papel de PTTG en los adenomas hipofisarios</b> .....	<b>20</b>
II.6.1.	Características clínicas .....	21
II.6.2.	Subtipo de adenoma .....	21
II.6.3.	Secreción hormonal.....	21
II.6.4.	Tamaño tumoral y la capacidad de invasión .....	22
II.6.5.	Proliferación celular.....	22
II.6.6.	Angiogénesis.....	22
II.6.7.	Pronóstico.....	22
II.6.8.	Respuesta a tratamiento médico.....	23

<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>IV.1. Hipótesis .....</b>	<b>28</b>
<b>IV.2. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
IV.2.1. Objetivo principal .....	29
IV.2.2. Objetivos secundarios .....	29
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>V.1. Muestra y diseño del estudio.....</b>	<b>32</b>
V.1.1. Ámbito del estudio .....	32
V.1.2. Diseño del estudio .....	32
<b>V.2. Descripción del estudio.....</b>	<b>34</b>
V.2.1. Fases del estudio .....	34
V.2.2. Variables explicativas .....	34
V.2.3. Variables resultado.....	37
V.2.4. Recogida de las variables .....	38
<b>V.3. Aspectos éticos y de confidencialidad de datos.....</b>	<b>44</b>
<b>V.4. Análisis estadístico .....</b>	<b>44</b>
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>VI.1. Primera fase. Muestras conservadas en parafina.....</b>	<b>48</b>
VI.1.1. Descripción de la muestra .....	48
VI.1.2. Expresión de PTTG según el subtipo de adenoma hipofisario .....	51
VI.1.3. Asociación entre la expresión de PTTG y la extensión tumoral .....	51
VI.1.4. Asociación entre la expresión de PTTG y la invasión de estructuras adyacentes	53
VI.1.5. Asociación entre la expresión de PTTG y la agresividad tumoral .....	54
VI.1.6. Asociación entre la expresión de PTTG y el crecimiento de restos tumorales ..	54
VI.1.7. Modificación de la expresión de PTTG por el tratamiento médico previo .....	55
<b>VI.2. Segunda fase. Muestras congeladas .....</b>	<b>56</b>
VI.2.1. Descripción de la muestra .....	56

VI.2.2.	Expresión de PTTG según el subtipo molecular de adenoma hipofisario .....	57
VI.2.3.	Asociación de la expresión de PTTG con la extensión tumoral.....	59
VI.2.4.	Asociación de la expresión de PTTG con la invasión de estructuras adyacentes 59	
VI.2.5.	Asociación entre la expresión de PTTG y el grado de agresividad tumoral .....	60
VI.2.6.	Modificación en la expresión de PTTG por el tratamiento médico previo a la intervención quirúrgica .....	60
VI.2.7.	Expresión de E2F1, c-myc y Pri-miR-17~92 en función del subtipo molecular de adenoma hipofisario .....	61
VI.2.8.	Asociación de E2F1 y c-myc con las características clínicas del tumor hipofisario	63
VI.2.9.	Relación de la expresión de PTTG con aquella de E2F1 y c-myc .....	66
VI.2.10.	Expresión de microRNAs en función del subtipo de adenoma .....	67
VI.2.11.	Asociación en la expresión de los microRNAs con las características clínicas del tumor	69
VI.2.12.	Regulación de la expresión de PTTG por los diferentes miRNAs estudiados ..	73
VI.2.13.	Regulación de la expresión de E2F1 y c-myc por los diferentes miRNAs estudiados	73
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
<b>VII.1.</b>	<b>Distribución de las muestras estudiadas en función de la clasificación de los adenomas hipofisarios.....</b>	<b>76</b>
<b>VII.2.</b>	<b>Expresión de PTTG en los adenomas hipofisarios.....</b>	<b>77</b>
VII.2.1.	Diferencias entre subtipos de adenoma hipofisario.....	77
VII.2.2.	Diferencias según el comportamiento tumoral (invasividad, agresividad y / o recurrencia)	78
VII.2.3.	Efecto del tratamiento médico previo .....	80
<b>VII.3.</b>	<b>Expresión de E2F1 en los adenomas hipofisarios.....</b>	<b>81</b>
<b>VII.4.</b>	<b>Expresión de c-myc en los adenomas hipofisarios.....</b>	<b>83</b>
VII.5.	Expresión de los miRNAs estudiados en los adenomas hipofisarios	85
VII.5.1.	Cluster Pri-miR-17~92.....	85
VII.5.2.	Let-7 .....	85
VII.5.3.	Cluster miR-15a and miR-16-1 .....	86
<b>VII.6.</b>	<b>Regulación de PTTG .....</b>	<b>89</b>

VII.6.1. Adenomas gonadotropos.....	89
VII.6.2. Adenomas corticotropos silentes.....	89
VII.6.3. Adenomas corticotropos funcionantes.....	90
VII.6.4. Adenomas somatotropos.....	90
<b>VIII. LIMITACIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>X. ABREVIATURAS.....</b>	<b>95</b>
<b>XI. TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>97</b>
<b>XII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>101</b>
<b>CXCII. ANEXOS.....</b>	<b>115</b>









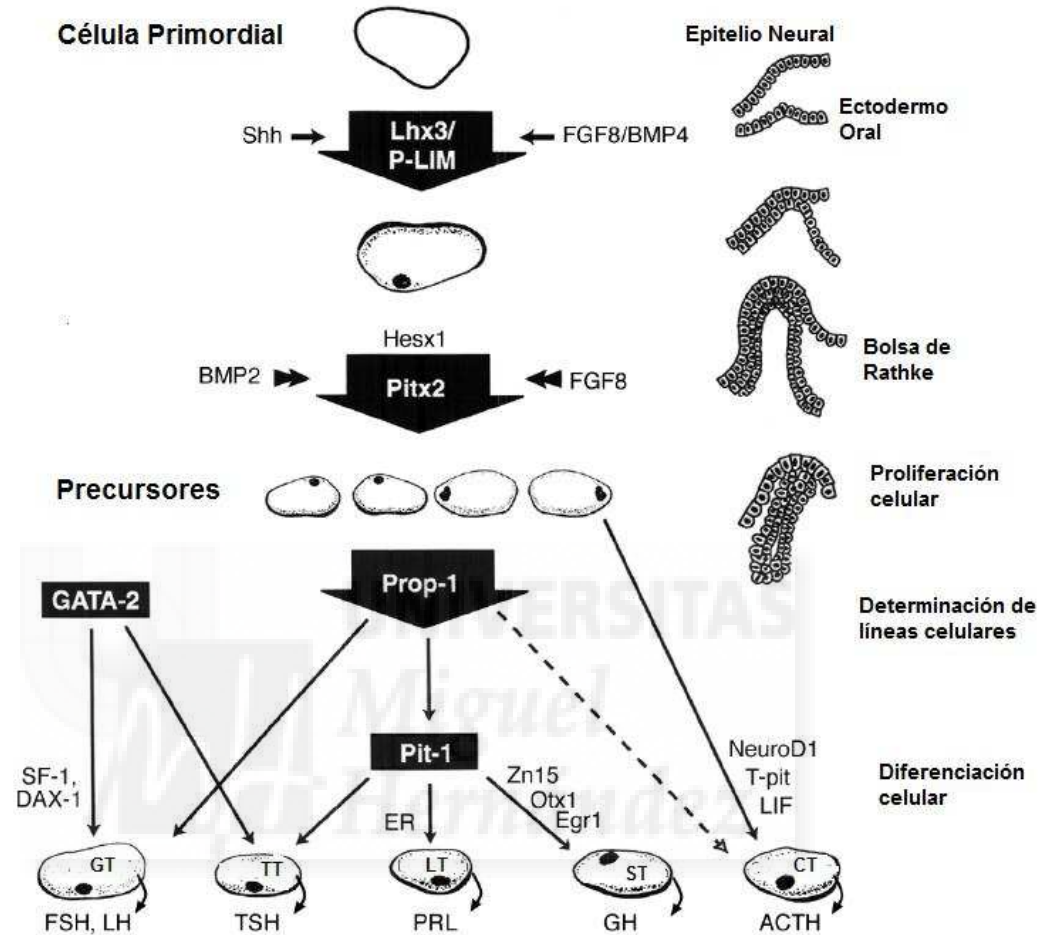
## ***II. INTRODUCCIÓN***

## **II.1. Patogenia de los adenomas hipofisarios**

Los adenomas hipofisarios (AH) son tumores derivados de las células neuroendocrinas que forman parte de la glándula hipofisaria. Constituyen el 10-15% de los tumores intracraneales (1). Originan síntomas derivados del crecimiento local (cefalea, náuseas, vómitos, parálisis de los pares craneales III, IV y VI y/o compresión quiasmática) o secundarios a la hiperfunción hormonal. La afectación de la glándula hipofisaria sana da lugar a déficits hormonales. Por lo general se consideran tumores benignos, pero pueden presentar crecimiento localmente infiltrativo y recidivar aunque raramente metastatizan, en cuyo caso se consideran carcinomas hipofisarios.

Se postula que los AH tienen un origen monoclonal por expansión de las células adenohipofisarias. Estas células se desarrollan a partir de las células primordiales de la cresta neural por la activación secuencial de determinados factores de transcripción que dan lugar a las células maduras en las que se expresan de los genes hormonales hipofisarios (Figura II.1-1)(2). Existe suficiente evidencia a favor del origen monoclonal de estos tumores: hay publicados estudios de X- inactivación y pérdida de heterocigosidad (LOH) a favor de la monoclonalidad, se encuentran rodeados de tejido hipofisario normal no-hiperplásico y la mayoría de AH presentan patrones de metilación de ADN no-randomizados. Esporádicamente se han descrito adenomas productores de prolactina con un origen policlonal debido a alteración en las vías regulatorias dopaminérgicas hipotalámicas (2).

**Figura II.1-1. Modelo de desarrollo de las líneas celulares adenohipofisarias determinado temporalmente por la activación de una cascada de factores de transcripción. Adaptada de Melmed 2003(2).**



Abreviaturas: Shh, Sonic Hedgehog; FGF, factor de crecimiento fibroblástico; BMP, proteína morfogenética del hueso; SF-1, factor de “splicing”; ER, receptor estrogénico; GT, gonadotropa; TT, tirotropa; LT, lactotropa; ST, somatotropa; CT, corticotropa.

Cada línea celular adenohipofisaria puede, por tanto, dar lugar a un subtipo de AH, que presentará unas características específicas, bien en cuanto al síndrome de hipersecreción hormonal que asocien si se trata de adenomas funcionantes, o bien en cuanto a los hallazgos anatomopatológicos e inmunohistoquímicos.

La clasificación actual de los AH publicada por la O.M.S. en 2004 se basa en criterios clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos (tabla II.1) (3, 4).

Tabla II.1-1. Clasificación de la OMS de los adenomas hipofisarios.

Tumor	Factor Transcripción	Hormonas (IHQ)
<b>Adenomas con positividad a GH</b> Adenomas somatotropos Densamente granulados Pobrementemente granulados Adenomas mammosomatotropos Adenoma mixto GH- PRL Adenomas plurihormonales productores de GH	Pit-1	GH $\alpha$ subunidad GH, PRL, $\alpha$ subunidad GH, PRL, $\alpha$ subunidad, $\beta$ TSH
<b>Adenomas con positividad a PRL</b> Adenomas lactotropos Densamente granulados Pobrementemente granulados Adenomas acidófilos	Pit-1, ER	PRL PRL (patrón Golgi) PRL(difuso) PRL,GH
<b>Adenomas con positividad a TSH</b> Adenomas tirotropos	Pit-1, TEF, GATA-2	$\alpha$ subunidad, $\beta$ TSH
<b>Adenomas con positividad a ACTH</b> A. corticotropos densamente granulados A. corticotropos Pobrementemente granulados Adenoma de células de Crooke	Tpit	ACTH ACTH ACTH
<b>Adenomas con positividad a gonadotrofinas</b> Adenomas gonadotropos	SF-1, ER, GATA-2	$\alpha$ subunidad, $\beta$ TSH, $\beta$ FSH
<b>Adenomas plurihormonales</b> Adenoma silente tipo 3 Adenomas plurihormonales inusuales	¿Múltiple?	Múltiple
<b>Adenomas con negatividad hormonal</b> Adenomas nulos	Ninguno	Ninguno

La causa de estos tumores continúa siendo desconocida y es probable que múltiples factores iniciadores y promotores estén involucrados. Menos de un 5% de los AH se engloba dentro de síndromes familiares tales como MEN1, complejo de Carney,

adenomas hipofisarios aislados familiares (FIPA) y síndromes paraganglioma en los que existe mutación germinal de los genes *menina*, *PRKARIA*, *CDKN1B*, *AIP* y *succinil deshidrogenasa* respectivamente (5). Dentro de los AH esporádicos, se han descrito algunas mutaciones somáticas, como la que afecta al gen *GNASI* descrita en el 30-40% de los adenomas somatotropos (6), pero se presupone que la patogénesis de la mayor parte de los AH esporádicos se debe a la activación de oncogenes. Sin embargo, no se ha podido demostrar la implicación de los oncogenes clásicos tales como ras, c-myc o c-fos, por lo que existe un porcentaje muy alto de estos tumores en los que el origen está aún por dilucidar (7).

Desde la descripción de PTTG en células tumorales hipofisarias en ratas GH3 en 1972, se le ha implicado en los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de los adenomas hipofisarios, así como en muchas otras neoplasias (8).



## **II.2. Familia PTTG**

La familia PTTG está formada por tres genes diferentes, cada uno de ellos localizado en distintos cromosomas: PTTG1 localizado en el cromosoma 5q35.1 (9) (aunque existe controversia puesto que también se le ha situado en 5q33(10)), PTTG2 en 4p15.1 (11) y PTTG3 en 8q13.1 (12). En humanos existe una fuerte homología estructural (mayor del 89%) entre ellos. PTTG1 es el más abundante y está ampliamente distribuido en tejidos sanos como el hígado fetal, testículo, timo, y se expresa en menor proporción en colon, intestino delgado, cerebro (incluyendo hipófisis), placenta y páncreas. A partir de este momento nos referiremos a este gen como PTTG.

Los otros dos genes de la familia se han asociado también a ciertas patologías. PTTG2 se ha detectado en pequeñas cantidades en cerebro, placenta, intestino delgado, colon, hígado, bazo, timo, próstata, testículo y ovario, y se ha comprobado su expresión en tumores hipofisarios, hepáticos, testiculares y ováricos (13). PTTG3 se ha relacionado con la maduración de los ovocitos y se ha detectado en neoplasias ováricas (14).



### II.3. Función PTTG

La proteína PTTG puede detectarse tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. Su traslocación al núcleo está mediada por el PTTG-binding factor (PBF) y por la vía de mitogen-activated protein kinasa (MAPK) (15). Las funciones enumeradas a continuación las lleva a cabo en su localización nuclear, mientras que su papel en el citoplasma permanece sin identificar (9).

#### II.3.1. *Regulación del ciclo celular*

Se ha correlacionado PTTG con la regulación de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. Para ello, forma un complejo con el factor de transcripción Sp1, regulando la expresión de la ciclina-D3 (16). Las ciclinas, elementos reguladores de las quinasas dependientes de ciclina (cdk), controlan en último lugar el ciclo celular mediante la fosforilación de diferentes sustratos. La presencia de las ciclinas-D es necesaria para la progresión de la fase G1 (17).

#### II.3.2. *Securina*

PTTG juega un importante papel durante la mitosis. En la metafase, los pares de cromátidas hermanas permanecen unidas mediante el complejo cohesina facilitando su orientación correcta en el huso mitótico (18). Este complejo se degrada mediante una separina en la transición hacia la anafase, permitiendo la disyunción de las cromátidas hermanas para dar lugar a células hijas diploides. PTTG se une a la separina durante la metafase, impidiendo la degradación del complejo cohesina y la separación precoz de las cromátidas hermanas (19).

#### II.3.3. *Transactivación. Factor de Transcripción*

Estudios en levaduras, roedores e *in vitro* han demostrado la capacidad de PTTG como factor transactivador de determinados genes. Se ha comprobado su función como factor de transcripción en 400 de 700 genes estudiados, implicados la mayoría de ellos (como c-myc y ciclina D3) en la regulación del ciclo celular, el control metabólico y de señales de transducción(16). Uno de los más estudiados es el factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2), incrementando su acción angiogénica y promitótica (20). También se le ha relacionado con el aumento de expresión de la *matrix metalloproteinase 2* (MMP2) favoreciendo la capacidad de invasión tumoral (16).

#### II.3.4. **Reparación ADN**

PTTG se une a la subunidad Ku-70 que regula la actividad de la *ADN-dependent protein kinase* (ADN-PK), implicada en la reparación de las roturas de ADN. Esta unión se inhibe por roturas de doble cadena del ADN, con lo que esta subunidad se activa iniciando los mecanismos de reparación. Al mismo tiempo, debido a su acción securina, inhibe la separación de las cromátidas hermanas retrasando la mitosis mientras se produce la reparación del ADN (21).

#### II.3.5. **Apoptosis**

La sobreexpresión de PTTG puede inducir apoptosis dependiente o independiente de p53 (22). PTTG regula la expresión del oncogén *c-myc*, que a su vez interactúa con el promotor de p53 potenciando su transcripción (16). Sin embargo, estudios en cultivos celulares utilizando *short interfering RNA* (siRNA), cuya función es disminuir la expresión de PTTG, o mediante la transfección de PTTG con lo que se induce su sobreexpresión, muestran una relación inversa entre la expresión de PTTG y p53 (13). Por otra parte, en determinados tipos celulares se ha evidenciado que PTTG se une a p53 con lo que inhibe su unión al ADN y con ello la transactivación y apoptosis mediada por p53. Por todo esto, la relación entre estos dos genes parece ser contexto-dependiente (23).

En cuanto a la apoptosis independiente de p53, los mecanismos involucrados no están aclarados, aunque se ha comprobado que PTTG estimula directamente a Bax, el cual promueve la apoptosis por la vía mitocondrial. (22, 24).

#### II.3.6. **Senescencia**

Las células pueden responder a situaciones de estrés en el ADN entrando en apoptosis o mediante el “arresto proliferativo” (también llamado senescencia celular). Como se ha descrito anteriormente, PTTG puede promover la transcripción de p53 estimulando a su vez la expresión de p21 en situaciones de estrés celular. p21 es un inhibidor de kinasas dependiente de ciclina que inhibe la formación de los complejos ciclina-CDK2 ó CDK4. Además, regula la progresión de la fase G1 activando la senescencia en células inestables o aneuploides, la replicación del ADN, así como la entrada de las células en apoptosis. Por estos mecanismos, controla el crecimiento tumoral e impide la transformación maligna en determinados tejidos como la hipófisis (25).



## II.4. Regulación de PTTG

Estudios in vitro y en roedores han demostrado la importancia de determinadas sustancias en la regulación de la expresión de PTTG, modulando su función o favoreciendo su degradación.

### II.4.1. *Regulación de la expresión de PTTG mediante hormonas y factores de crecimiento*

Los estrógenos fueron el primer regulador descrito de PTTG. Aumentan la expresión de ARNm del mismo, aunque esta regulación parece ser específica de determinados tipos celulares (principalmente hipofisarios y tiroideos). Se han descrito dos regiones de unión del receptor de estrógenos en el promotor de PTTG, aunque todavía no se ha confirmado que se trate de lugares de unión funcionales (26-28). Otro mecanismo de regulación de los estrógenos podría estar mediado por la TSH (hormona estimulante del tiroides), puesto que se ha comprobado que los estrógenos pueden aumentar las concentraciones séricas de esta hormona, la cual es capaz de inducir la expresión de PTTG en células tiroideas (29).

La expresión de PTTG también se ha correlacionado con la insulina y el IGF1 (Insulin-like growth factor) en líneas celulares de cáncer de mama y astrocitomas. Se han identificado dos secuencias en el promotor de PTTG que responden a la insulina y al IGF1, explicando así una de las posibles vías de regulación (9, 30-32).

Estudios en diferentes cultivos celulares (astrocitomas y células adenohipofisarias) han demostrado expresión de PTTG mediada por los ligandos del EGFR (epidermal growth factor receptor), por el propio EGF y por TGF- $\alpha$  (transforming growth factor receptor- $\alpha$ ). La expresión de PTTG mediada por EGFR ha sido estudiada en células foliculoestrelladas de ratón TtT-CF. Se ha comprobado que la activación de este receptor da lugar a un aumento en la expresión de ARNm de PTTG mediante las cascadas PI3K- proteín cinasa C y MAPK, con un pico de expresión en la transición entre las fases S-G2, indicando que la expresión de este gen es altamente dependiente de la fase del ciclo celular. Otro dato a favor de esta dependencia, es que al bloquear el ciclo en fase S no se produce el aumento en la expresión de PTTG (33).

#### II.4.2. ***Regulación de la expresión de PTTG mediante factores de transcripción***

El factor de transcripción SP1 es importante para la transcripción en situación basal de PTTG. Se han descrito mutaciones alrededor del lugar de unión de SP1 que reducen la actividad del promotor de PTTG en torno al 70%, mientras que la sobreexpresión de este factor de transcripción estimula la actividad del promotor (34).

NF-Y se ha implicado en la regulación de la expresión de PTTG mediada por p53. Se ha comprobado que mutaciones en la región de unión de NF-Y en el promotor PTTG ocasionan una reducción del 25% de la actividad de éste (34). p53 interactúa con NF-Y impidiendo su unión al promotor, dando lugar, por tanto, a una reducción en la expresión de PTTG (35).

Otra vía de regulación parece ser la del factor de transcripción E2F1, ya que se ha descrito la co-sobreexpresión de ambos genes. Además se ha comprobado mediante inmunoprecipitación que E2F1 se une al promotor de hPTTG1 (36). E2F es una familia de factores de transcripción que controla la expresión de genes importantes para la progresión del ciclo celular, apoptosis, diferenciación celular y reparación de ADN. Se ha comprobado su implicación en numerosos cánceres humanos (renal, hepatocarcinoma, glioma, entre otros) debido a la desregulación de su actividad transcripcional como resultado de alteraciones en la vía p16 (INK4a)-cyclinaD1-Rb. Su función como oncogen o gen supresor tumoral depende del contexto tumoral (37, 38), estando influenciada por algunos microRNAs (miRNAs) (37, 39-43).

#### II.4.3. ***Regulación de la expresión de PTTG mediante otro tipo de factores***

La vía de la beta catenina/T cell factor (TCF) se ha implicado en la regulación de la expresión de PTTG en carcinomas escamosos del esófago (44), así como en la tumorigénesis hipofisaria y carcinomas de colon (45). El promotor de PTTG contiene una secuencia de unión a TCF-4 que puede ser activada tanto por beta-catenina como por gamma-catenina (46).

Otros factores relacionados son el calcio, factor de crecimiento hepatocitario, ciclosporina A y los corticoides (13, 47).

#### II.4.4. *Cambios epigenéticos*

##### II.4.4.1 **MicroRNAs**

Los microRNAs (miRNAs) son fragmentos pequeños de unos 21-22 nucleótidos de ARNm que no codifican proteínas. Tienen la capacidad de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante la fragmentación del ARNm o bien mediante la inhibición de la síntesis proteica lo que les confiere funcionalidad como genes supresores de tumores, cuando su objetivo es un oncogen, o por el contrario como oncogenes al actuar sobre genes supresores de tumores (48).

No existen datos en la literatura a cerca de la regulación de PTTG por miRNAs. Sin embargo, si que se han descrito ciertos cluster capaces de regular genes que a su vez están implicados en la expresión de PTTG, tales como c-myc o E2F1 (39).

##### II.4.4.2 **Acetilación de histonas**

En cultivos celulares se ha comprobado que la acetiltransferasa de histonas (HAT) p300 es capaz de regular al alza la expresión de PTTG tanto a nivel de ARNm como de proteínas. Mediante inmunoprecipitación de cromatina se ha demostrado que la sobreexpresión de HATp300 se asocia a un incremento en la acetilación de las histonas H3 del promotor de PTTG (49).

##### II.4.4.3 **Otros cambios epigenéticos**

Estudios de epigenética empleando líneas celulares de cáncer de próstata no han hallado relación entre el estado de metilación o la pérdida de heterogocisidad y la expresión de PTTG (50).

#### II.4.5. *Fosforilación proteica*

La fosforilación de la proteína PTTG facilita su traslocación al núcleo (51), lo que depende de la fase del ciclo celular en que se encuentre (21, 52). Ésta parece ser importante para la función como factor de transcripción de PTTG (52). En ella interviene la quinasa dependiente de ciclina 2 (cdk2), especialmente en la fase S, que puede activarse por tres vías diferentes: Phosphoinositol-3-kinasa (PI3K), MAPK o la

subunidad Ku70 de la ADN-PK (53). La pérdida de fosforilación da lugar a un incremento en la transformación y la proliferación celular, mientras que el aumento en la fosforilación tiene el efecto contrario (20).

#### II.4.6. ***Degradación***

PTTG se degrada rápidamente al final de la metafase gracias a la ubiquitina del complejo promotor de la anafase para asegurar la separación de las cromátidas hermanas (19).



## II.5. Papel de PTTG en la tumorigenesis

La sobreexpresión de PTTG se ha comprobado en múltiples neoplasias, incluyendo tumores hipofisarios, carcinoma de pulmón, mama, endometrio, esófago, colon, recto, tiroides, ovario, testículo, gliomas, etc (13, 47).

### II.5.1. *Proliferación celular*

El efecto de PTTG en la proliferación celular no está aclarado. Como proteína oncogénica sería esperable un aumento de la actividad proliferativa, pero como securina debería inhibir dicha proliferación. Ambos posibles efectos han sido demostrados tanto en estudios clínicos como *in vitro* (26, 54, 55). Incluso se ha comprobado cómo la sobreexpresión relativamente baja (1.7 veces) estimula la proliferación celular, mientras que una sobreexpresión alta (6 veces) inhibe el recambio celular (56).

Parte del efecto sobre la proliferación celular está mediado por la activación del proto-oncogen *c-myc* (24, 57). Este oncogen regula la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular mediante la activación directa de diferentes microRNAs (miRNAs) que regulan la expresión, entre otros, del factor de transcripción E2F1 (39, 40).

### II.5.2. *Aneuploidía (e inestabilidad genética)*

Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* la asociación entre la sobreexpresión de PTTG y el aumento de aneuploidía e inestabilidad genética en diversos tumores y líneas celulares (55, 58). Su acumulación (debido a sobreexpresión o fallo en su degradación) inhibe la progresión de las mitosis y la segregación cromosómica, dando lugar a aneuploidía con implicación significativa en el potencial oncogénico.

### II.5.3. *Invasión y angiogénesis*

La sobreexpresión de PTTG parece actuar de forma autocrina/paracrina incrementando la expresión de ciertos factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis, como FGF-2 o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (47). Estudios *in vivo* e *in vitro* han correlacionado la sobreexpresión de PTTG con la neovascularización, expresión de FGF-2 y de VEGF-A (55, 59, 60).

## II.6. Papel de PTTG en los adenomas hipofisarios

Los estudios llevados a cabo sobre AH son heterogéneos en cuanto a número de pacientes, tipo de adenomas estudiados, variables clínicas y técnicas de determinación de PTTG, tal y como se muestra en la tabla II.6-1.

**Tabla II.6-1. Características de la mayoría de estudios publicados sobre expresión de PTTG en adenomas hipofisarios.**

Autor	Muestra	Método de determinación de PTTG	de Resultados
Zhang 1999 (59)	54 AH Hipófisis normales	RT-PCR	Mayor expresión de PTTG que en tejido normal en: 23/30 NF, 9/10 LT, 13/13 ST, 1/1 CT. Mayor expresión en adenomas funcionantes con invasión del seno esfenoidal
Hunter 2003 (61)	40 AH	RT-PCR	ST mayor expresión que NF (OR 2.3). No correlación con el volumen tumoral.
Mc Cabe 2003 (62)	121 AH: 92 NF, 16 ST, 5 PRL, 5 CT, 5 TT. 10 hipófisis normales	qPCR Western Blot	Expresión de PTTG 5 veces mayor en AH que en hipófisis normales. No correlación con variables radiológicas ni recurrencia.
Filippella 2006 (63)	45 AH: 18 NF, 8 ST, 14 PRL, 6 CT. Hipófisis normales.	qPCR	Mayor expresión en AH que en tejido normal (+89%). No correlación con variables radiológicas. Mayor expresión en tumores recurrentes.
Wierinckx (64)	2007 25 PRL Muestras de PRL de roedor .	Inmunohistoquímica	No asociación con el curso clínico.
Minematsu (65)	2006 51 AH: 29 ST, 12 PRL, 6 CT, 3 TT, 34 GT, 16 Nulo.	qPCR	Mayor expresión en AH que en tejido normal.
Tena-Suck (66)	2008 45 AH: 24 funcionantes, 21 NF	Inmunohistoquímica	NF mayor expresión que funcionantes.
Noh 2009 (67)	35 NF: 26 recurrentes y 9 sin recurrencia	Inmunohistoquímica	Asociación con recurrencia temprana, no con tardía.
Raverot 2010 (68)	94 PRL	qPCR	Asociación con recurrencia o progresión.

			No relación con invasión.
Salehi 2010 (69)	89 AH	Inmunohistoquímica	ST mayor expresión que resto de subtipos.
Jia 2013 (70)	70 AH: 32 NF, 6 PRL, 10 ST, 14 GT, 3 CT, 1 TT, 4 Mixtos	qPCR	Mayor expresión PTTG en invasivos y CT. No relación con reintervención.
AH, adenomas hipofisarios; NF, adenomas hipofisarios no funcionante; GT, gonadotropos; ST, somatotropos; CT, corticotropos; PRL, prolactinomas; TT, tirotropos. PCR, reacción en cadena de la polimerasa			

### II.6.1. *Características clínicas*

Ningún autor encontró relación entre la sobreexpresión de PTTG y características tales como edad, sexo o síntomas clínicos al diagnóstico (25, 61, 62).

### II.6.2. *Subtipo de adenoma*

Todos los trabajos referían mayor expresión de PTTG en los adenomas hipofisarios comparados con hipófisis normal. En tres estudios encontraron mayor grado de expresión en los funcionantes con respecto a los no funcionantes (25, 59, 61). Se ha objetivado un mayor grado de sobreexpresión en los adenomas somatotropos (25, 59, 65, 69). Filippella (63) por el contrario, describió mayor expresión de PTTG en adenomas nulos seguidos de gonadotropos, mientras que Jia (70) por el contrario encontró una mayor expresión de este gen en los adenomas corticotropos. Sin embargo, Minematsu (65) y McCabe (62) no encontraron diferencias de expresión en los adenomas tirotropos comparados con las hipófisis normales, proponiendo que estos tumores presentan una fisiopatología diferente.

Incluyendo parte de los estudios referidos en la tabla II.6-1, se han publicado recientemente dos metaanálisis que valoraban la expresión de PTTG según la funcionalidad del AH sin encontrar diferencias significativas (71, 72).

### II.6.3. *Secreción hormonal*

Hunter y colaboradores (61) analizaron la secreción hormonal in vitro y el grado de sobreexpresión de PTTG, encontrando una correlación positiva estadísticamente significativa con la secreción de GH. Esto va a favor de los datos obtenidos previamente en cultivos celulares de células lactosomatotropas, donde la sobreexpresión de PTTG aumentaba la secreción y expresión de ARNm de GH y disminuía la de PRL (73).

#### II.6.4. **Tamaño tumoral y la capacidad de invasión**

Para Zhang y colaboradores (59) hubo una correlación positiva entre la invasión del seno esfenoidal en los adenomas funcionantes y la sobreexpresión de PTTG, lo que supondría un comportamiento más agresivo. Jia (70) describe una mayor expresión de PTTG en los adenomas invasivos que en los no invasivos, aunque no encuentra diferencias en cuanto al volumen tumoral. Sin embargo otros autores no encontraron diferencias en cuanto al tamaño o invasividad tumoral y la expresión de este gen (61, 62, 64, 68).

Por otra parte, los metaanálisis anteriormente referidos (71, 72) valoraron también la relación con la invasión de estructuras adyacentes, encontrando que la mayor expresión de PTTG se asociaba a tumores invasivos. En esta caso sólo incluyeron estudios realizados con población asiática y con determinación inmunohistoquímica (IHQ) de la proteína.

#### II.6.5. **Proliferación celular.**

Filippella (63) demostró correlación entre los niveles de PTTG y la proliferación celular (medido con Ki67), lo que se asoció a un peor pronóstico. Por el contrario, Minematsu (65) encontró correlación sólo en las hipófisis normales. Wierinckx (64) describió un subtipo de adenoma al que denominó “atípico”, en el que existía sobreexpresión de PTTG nuclear junto con aumento de Ki67 y p53.

#### II.6.6. **Angiogénesis**

Los resultados de McCabe (62) mostraron una asociación entre PTTG y VEGF (y su receptor KDR), también descrita por Minematsu (65) en adenomas somatotropos en relación con el número de vasos (estudiados mediante inmunohistoquímica con CD34). Sin embargo, Hunter (61) no encontró correlación.

#### II.6.7. **Pronóstico.**

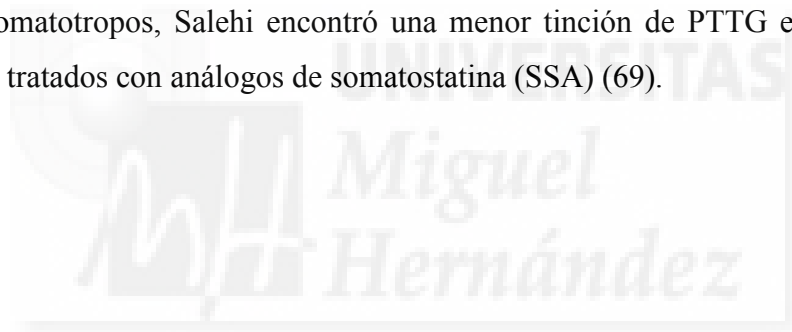
Filippella (63) estudió a 27 pacientes con seguimiento mayor de un año (máximo de 72 meses) y encontró que los adenomas con mayor sobreexpresión de PTTG y niveles altos de Ki67 presentaban un menor tiempo de recidiva. Estableció como nivel de corte para distinguir grupos de riesgo PTTG y Ki67 de 3.3% (sensibilidad 60%, especificidad 76%), aunque el mejor marcador pronóstico fue la presencia de Ki67 >2.9%. Por otra



parte, Wierinckx (64) estudió 25 pacientes con prolactinomas con seguimiento superior a un año (media de 93 meses), dividiendo los adenomas en tres subtipos en función de su agresividad. Describió el “adenoma atípico” caracterizado por presentar mayor porcentaje de recidivas (siendo éstas más precoces), correlacionadas con la sobreexpresión de PTTG nuclear, mayor índice de Ki67 y sobreexpresión de p53. Sin embargo, no encontró diferencias en la expresión de PTTG entre los tumores recurrentes y los no recurrentes. Otro estudio sobre una muestra de prolactinomas también mostró asociación entre la expresión este gen y la recurrencia tumoral (68). Sin embargo, Jia (70) no encontró diferencia en los niveles de expresión de PTTG en cuanto a la tasa de recidiva tumoral (definida como reintervención quirúrgica).

#### **II.6.8. *Respuesta a tratamiento médico***

Los estudios en adenomas lactotropos no demostraron asociación entre PTTG y la resistencia al tratamiento con agonistas dopaminérgicos (AD) (74, 75). Dentro de los adenomas somatotropos, Salehi encontró una menor tinción de PTTG en los tumores previamente tratados con análogos de somatostatina (SSA) (69).







### **III. JUSTIFICACIÓN**

Aunque la participación de PTTG en la tumorigenesis y comportamiento de diferentes tumores ha sido bastante estudiada, su función y regulación en los adenomas hipofisarios (AH) está por evaluar.

De este modo, la discordancia en los estudios realizados hasta el momento sobre el papel de PTTG en los AH podría estar justificada por una regulación diferente en la expresión de esta proteína según el subtipo de AH.





#### ***IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

#### **IV.1. Hipótesis**

En los diferentes subtipos de adenoma hipofisario (AH) la alteración del equilibrio en la vía c-myc/ E2F/ PTTG modificará la función de PTTG de securina a factor de transcripción, condicionando un comportamiento más agresivo de estos tumores.

Esta premisa previa estará condicionada por la influencia del patrón de expresión de diferentes microRNAs según el subtipo de AH.



## **IV.2. Objetivos**

### **IV.2.1. *Objetivo principal***

- Cuantificar la expresión génica de PTTG y evaluar su regulación por la vía c-myc/E2F en los diferentes subtipos de AH.
- Examinar la diferente regulación de la vía c-myc/ E2F/ PTTG por microRNAs según el subtipo de AH.

### **IV.2.2. *Objetivos secundarios***

- Valorar la expresión génica de PTTG en los diferentes subtipos de AH.
- Cuantificar la expresión de ARNm de PTTG según el tamaño y la extensión tumoral.
- Cuantificar la expresión de ARNm de PTTG según la recurrencia tumoral.
- Cuantificar la expresión de ARNm de PTTG según la agresividad tumoral.
- Valorar la expresión génica de E2F1 y c-myc en los diferentes subtipos de AH.
- Cuantificar la expresión de ARNm de E2F1 y c-myc según el tamaño y la extensión tumoral.
- Cuantificar la expresión de ARNm de E2F1 y c-myc según la agresividad tumoral.
- Establecer la relación entre la expresión génica de PTTG y E2F/ c-myc en los AH.
- Valorar el efecto del tratamiento médico previo en la expresión génica de PTTG, E2F1 y c-myc.
- Cuantificar la expresión de microRNAs miR-16-1, miR-15a, miR-20a, miR-17-5p y Let-7a en los diferentes subtipos de AH.
- Cuantificar la expresión de dichos miRNAs según el tamaño y la extensión tumoral.
- Cuantificar la expresión de dichos miRNAs según la agresividad tumoral.
- Valorar el efecto del tratamiento médico previo en la expresión de dichos miRNAs.

- Establecer la relación entre la expresión génica de PTTG y los microRNAs en los diferentes subtipos de AH.
- Establecer la relación entre la expresión génica de E2F1/c-myc y los microRNAs en los diferentes subtipos de AH.







## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

## V.1. Muestra y diseño del estudio

### V.1.1. *Ámbito del estudio*

Este estudio se ha llevado a cabo en la Unidad de Patología Hipofisaria del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA) y dentro del entorno del Registro Español Molecular de Adenomas Hipofisarios (REMAH) de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN).

El proyecto REMAH consiste en una iniciativa multidisciplinar básico-clínica con intención traslacional desarrollada por la SEEN desde 2010, cuyo objetivo es incrementar el conocimiento sobre la expresión génica en tumores hipofisarios y aportar información molecular sobre éstos que ayude al clínico en el tratamiento del paciente. Consta de un registro común de características clínicas, bioquímicas, patológicas y moleculares ([www.remahnacional.com](http://www.remahnacional.com)) y seis nodos de investigación básica, uno de los cuales está establecido en nuestro centro.

### V.1.2. *Diseño del estudio*

El diseño elegido para la realización de este trabajo ha sido un estudio descriptivo y analítico retrospectivo de las muestras de adenoma hipofisario almacenadas en el Biobanco del HGUA.

En una primera fase, se realizó un estudio retrospectivo longitudinal sobre muestras de AH en parafina para valorar la expresión génica de PTTG en los AH y su asociación con el crecimiento de restos tumorales a largo plazo.

En una segunda fase, se ha realizado un estudio transversal con recogida de muestras congeladas de forma prospectiva para valorar las posibles diferencias en la expresión y regulación de PTTG según el subtipo de AH. Para ello se ha llevado a cabo una selección de muestras según el subtipo de AH.

Ambas fases del estudio fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital General Universitario de Alicante y se han obtenido consentimientos informados de los pacientes.

### **V.1.2.1. Población a estudio**

#### **V.1.2.1.1. Criterios de inclusión**

- Fase I: Estudio con muestras en parafina:
  - o Tejido tumoral hipofisario conservado en parafina de pacientes intervenidos en el HGUA durante los años 1995-2008.
  - o Seguimiento mínimo tras la cirugía de tres meses.
- Fase II: Estudio con muestras congeladas:
  - o Tejido tumoral hipofisario recogidos en el nodo de Alicante del proyecto REMAH entre 2010 y 2013, preservados en RNA-later durante las 24-48h siguientes a la intervención a 4°C y posteriormente congelados a -20°C.
  - o Hipófisis normales procedentes de autopsias realizadas en HGUA entre 2010 y 2012, preservadas en RNA-later durante las 24-48h siguientes a la extracción a 4°C y posteriormente congeladas a -20°C.
- Firma del consentimiento informado o autorización de la exención del mismo al CEIC del HGUA en el caso de las autopsias o pacientes fallecidos.
- Disponibilidad de suficiente información clínica, radiológica y patológica.

#### **V.1.2.1.2. Criterios de exclusión**

- Casos con escasa cantidad de tejido tumoral no apto para la realización de los estudios anatomopatológicos y moleculares.
- Problemas de calidad del ARN.
- No aceptación del paciente de inclusión en el estudio.

#### **V.1.2.1.3. Muestra:**

- Estudio retrospectivo con muestras en parafina: 46 casos.
- Estudio transversal con muestras congeladas: 60 casos de adenomas hipofisarios y nueve hipófisis normales.

**V.1.2.1.4. Tipo de muestreo:** secuencial.

**V.2. Descripción del estudio**

**V.2.1. Fases del estudio**

**V.2.1.1. Primera fase**

El estudio se ha realizado en dos fases, la primera fase fue un estudio retrospectivo, en el que se han analizado las principales características clínicas de los AH intervenidos en nuestro centro entre 1995 y 2008, con un seguimiento post-quirúrgico mínimo de tres meses. Para ello se realizó un análisis de la base de datos de la Unidad de Patología Hipofisaria (ver apartado V.2.4). De éstos se valoró la calidad de ARN de la muestra conservada en parafina y se seleccionaron aquellos casos con suficiente material para llevar a cabo los experimentos oportunos. En esta primera fase se valoró la expresión de PTTG y su relación con el tamaño y la capacidad de crecimiento del tumor.

**V.2.1.2. Segunda fase**

La segunda fase ha consistido en un estudio trasversal cuyo objetivo ha sido evaluar la posible variación en la expresión de PTTG en función de su diferente regulación según el subtipo de AH. Para ello se han seleccionado 60 muestras recogidas de los subtipos más frecuentes de AH de la colección de adenomas hipofisarios del Biobanco de HGUA.

**V.2.2. Variables explicativas**

**V.2.2.1. Variables clínicas**

1. *Síndrome por hipersecreción hormonal.* Se recogió la clínica que presentaba el paciente: acromegalia, síndrome de Cushing, hipertiroidismo, síndrome de galactorrea-amenorrea.

2. *Déficits hormonales al diagnóstico.* Se refiere al déficit en la función corticotropa, somatotropa, tirotrópica o gonadotropa previa a la intervención quirúrgica. Asimismo se contempla la existencia de diabetes insípida.
3. *Tratamiento médico prequirúrgico.* Se consideró exclusivamente el tratamiento con agonistas dopaminérgicos (cabergolina o bromocriptina, AD), análogos de la somatostatina (octreótide o lanreótide, SSA), pegvisomant o ketokonazol.
4. *Tipo de intervención quirúrgica:* transesfenoidal o transcraneal. Además se diferenció entre si era la primera exéresis del tumor o se trataba de una reintervención.
5. *Déficits hormonales postquirúrgicos.* Se recogió la alteración en la función corticotropa, somatotropa, tirotrópica o gonadotropa o la aparición de diabetes insípida posterior a la intervención quirúrgica.
6. *Persistencia de enfermedad bioquímica o radiológica tras la intervención.* En el estudio con muestras en parafina se valoró la persistencia de enfermedad como el mantenimiento de concentraciones hormonales elevadas en los casos de AH funcionantes o la presencia de restos tumorales en la resonancia magnética nuclear (RMN) de control a los 3 meses de la intervención quirúrgica, tanto en los tumores funcionantes como en los adenomas no funcionantes.
7. *Tratamiento médico aplicado post-quirúrgico.* En el estudio con muestras en parafina se recogió la prescripción de AD, SSA, pegvisomant o ketokonazol.
8. *Necesidad de reintervención y respuesta a la misma.* En el estudio con muestras en parafina se recogió si durante el seguimiento el tumor fue reintervenido y el motivo de la reintervención (persistencia de enfermedad o crecimiento de restos tumorales).
9. *Radioterapia post-quirúrgica.* En el estudio con muestras en parafina se valoró la necesidad de tratamiento con radioterapia, el motivo (persistencia de enfermedad o crecimiento de restos tumorales), el tipo de radioterapia (estereotáxica o convencional) y la respuesta a la misma.

#### **V.2.2.2. Variables radiológicas**

1. *RMN preoperatoria.* En ambas fases del estudio se recogieron las características de la RMN preoperatoria recuperadas de las bases de datos.

1.1. *Tamaño tumoral*, como diámetro mayor de los diámetros anteroposterior, craneocaudal y transversal medidos en milímetros.

1.2. *Extensión tumoral*, según la clasificación de Hardy: I-II: intraselar; III: extraselar; IV: invasivo.

2. *RMN a los 3-6 meses de la intervención quirúrgica*. En el estudio con muestras en parafina se valoró esta prueba para definir:

2.1. *Persistencia de restos tumorales*. Si se objetivó que la exéresis tumoral fue incompleta.

2.2. *Tamaño tumoral*, como el diámetro mayor de los diámetros anteroposterior, craneocaudal y transversal medidos en milímetros.

3. *Crecimiento de restos tumorales*. Dentro del estudio con muestras en parafina se revisaron todas las RMN realizadas durante el seguimiento de aquellos pacientes que no recibieron ningún tratamiento tras la intervención quirúrgica. Se definió crecimiento significativo como el aumento superior al 20% en cualquiera de los diámetros del resto tumoral durante el seguimiento.

#### **V.2.2.3. Variables patológicas**

1. *Subtipo hormonal de adenoma según la clasificación de la O.M.S. 2004*. Se recogió la clasificación del AH de las bases de datos de la Unidad de Patología Hipofisaria del HGUA y del REMAH en cada una de las fases respectivamente.

2. *Actividad proliferativa del AH mediante Ki67%*. Se recogió de las bases de datos de la Unidad de Patología Hipofisaria del HGUA y del REMAH en cada una de las fases respectivamente.

#### **V.2.2.4. Variables moleculares**

1. *Cuantificación de ARNm mediante qPCR*. Se cuantificó la expresión génica de PTTG en ambas fases del estudio. Además en la segunda fase con muestras congeladas se cuantificó el ARNm de E2F1, c-myc, Ki67 y pri-miR-17-92.

2. *Cuantificación de microRNAs mediante qPCR*. En las muestras congeladas se cuantificó la expresión de miR-17-5p, miR-20a, miR16-1, miR-15a y Let-7.

### V.2.3. Variables resultado

#### V.2.3.1. Primera fase. Estudio en muestras conservadas en parafina.

1. *Extensión tumoral.* Se comparó la expresión de PTTG entre los adenomas intraselares (grados I-II de Hardy) y los adenomas extraselares (grados III-IV).
2. *Invasividad tumoral.* Se comparó la expresión de PTTG de los adenomas no invasivos (grados I-III de Hardy) frente a los adenomas que invadían estructuras adyacentes (grados IV).
3. *Agresividad tumoral.* Se evaluó la expresión de PTTG según el grado de agresividad tumoral, definido como: 1) agresividad alta, si la tinción de Ki-67 era superior o igual a 3% y el tumor era invasivo; 2) agresividad media, si Ki-67 era superior o igual 3% o el tumor invadía estructuras adyacentes; 3) agresividad baja, en el caso de que Ki-67 fuese inferior a 3% y el tumor no fuese invasivo.
4. *Crecimiento de restos tumorales.* Se comparó la expresión de PTTG de los adenomas sin tratamiento médico o radioterápico tras la intervención quirúrgica que presentaron un incremento mayor del 20% en cualquiera de los diámetros del resto tumoral durante el seguimiento frente a aquellos que no experimentaron crecimiento.

#### V.2.3.2. Segunda fase. Estudio en muestras congeladas.

1. *Extensión tumoral.* Se comparó la expresión de PTTG, E2F1, c-myc y los microRNAs estudiados entre los adenomas intraselares (grados I-II de Hardy) y los adenomas extraselares (grados III-IV).
2. *Invasividad tumoral.* Se comparó la expresión de PTTG, E2F1, c-myc y los microRNAs estudiados de los adenomas no invasivos (grados I-III de Hardy) frente a los adenomas que invadían estructuras adyacentes (grados IV).
3. *Agresividad tumoral.* Se estudió la expresión de PTTG, E2F1, c-myc y los microRNAs estudiados en función del grado de agresividad. Ésta se clasificó en 3 grados: 1) agresividad alta, si la expresión de Ki-67 era superior o igual a 2.59 FC y el tumor era invasivo; 2) agresividad media, si Ki-67 era superior o igual a 2.59 FC o el tumor invadía estructuras adyacentes; 3) agresividad baja, en el caso de que la expresión de Ki-67 fuese inferior a 2.59 FC y el tumor no fuese invasivo.

#### V.2.4. **Recogida de las variables**

##### **V.2.4.1. Variables clínicas, radiológicas y patológicas**

Las variables especificadas se recogieron de las bases de datos de la Unidad de Patología Hipofisaria del HGUA y de proyecto REMAH. En los casos con pérdida de información, se revisó la historia clínica del paciente.

##### **V.2.4.2. Variables moleculares**

###### *V.2.4.2.1. Primera fase: Estudio en muestras en parafina.*

###### 1. Extracción ARN:

Se usaron dos cilindros de 0,6 mm de espesor de áreas de tumor preseleccionadas conservadas en parafina para realizar la extracción y aislamiento de ARN total mediante RNAeasy FFPE Kit (QIAGEN) según el protocolo y trabajando bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. Se comprobó la calidad y cantidad de ARN extraído mediante NanoDrop.

###### 2. Análisis de patrones de expresión génica:

Se realizó la transcripción inversa de 2 g de ARN en volúmenes de reacción de 20 µl con cebadores hexámeros aleatorios, con High Capacity cADN Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®) y almacenados a -20°C hasta su uso.

Para seleccionar los genes control, se analizó la expresión de 32 genes housekeeping en tres pool consistentes en 10 muestras mezcladas en una placa endógeno comercial basada en tecnologías de ensayo TaqMan (Applied Biosystems). Los resultados al ser analizados con el software GeNorm, muestran que los genes más estables fueron GAPDH y YWHAZ.

La técnica de elección para la cuantificación de los niveles de expresión fue la PCR cuantitativa. Este procedimiento se basa en la amplificación exponencial del cADN de interés en presencia de sondas fluorescentes específicas que se unen al fragmento a amplificar. La cuantificación de la fluorescencia generada al degradarse la



sonda por la actividad exonucleasa de la polimerasa, permite una cuantificación relativa de la cantidad inicial de copias del cADN en cuestión.

Para analizar la expresión génica de PTTG, seleccionamos el ensayo TaqMan específico que cumpliera los requisitos para nuestro tipo de muestra. Realizamos curvas estándar que se utilizaron para comprobar que la eficiencia de la amplificación de los genes housekeeping seleccionados y los genes diana fueron similares (con una diferencia menor del 10%). Se diseñaron cebadores específicos para amplificar los fragmentos ADNc detectados por cada ensayo TaqMan con Primer-BLAST. Los cebadores elegidos fueron valorados mediante la herramienta de búsqueda BLAST, que busca encontrar alguna similitud en secuencia. Como patrón se utilizó ARN total de cerebro comercial (Ambion®) y se transcribió junto a las muestras de adenoma.

La amplificación por PCR se realizó en un volumen de reacción de 25 µl que contenía 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada cebador, 1 unidad de KAPA2G Robust HotStar Taq polymerase (KAPABiosystems®) y 25 ng de ADNc. Las reacciones de PCR se amplificaron durante 35 ciclos con una temperatura de hibridación de 55°C. Los fragmentos amplificados se purificaron mediante el kit de purificación Qiaquick (Qiagen). Se confirmó la especificidad de los cebadores y se obtuvo la concentración de los fragmentos amplificados utilizando el 2100 Bioanalyzer (Agilent®).

Las diluciones se hicieron para los estándares tales como 109, 1.010, 1.011, 1.012, 1.013 y 1.014 copias de ARNm, calculados a partir de la ng total del producto de PCR (de acuerdo con la fórmula  $MW = [\text{número de nucleótidos} * 607,4] + 157,9$ ). Se realizó RT-PCR de diluciones seriadas por triplicado en 12,5 µl de volúmenes de reacción que contenía 6.25 µL de TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems®), 0.625 µL de TaqMan Gene Expression Assay, y 2.5 µL de template en 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Fueron analizadas utilizando el software SDS (Applied Biosystems®).

Los valores de R<sup>2</sup> para todas las curvas estándar generadas fueron superiores a 0,99 y todas las eficiencias de los ensayos TaqMan fueron superiores a 90%. Hicimos un control RT-negativo mediante el uso de ADN humano total (Roche) para asegurar que el ensayo TaqMan no detectase la amplificación de ADN genómico.

El análisis de las muestras se realizó de acuerdo con el mismo protocolo. Se incluyeron dos diluciones de las curvas de calibración y control negativo (NTC) en todas las placas de qPCR para garantizar que se mantuviesen las eficiencias y que estaban libres de contaminación. Todos los análisis se realizaron por duplicado. Los resultados de cada placa sólo se validaron cuando el NTC era indetectable y la dCt mantuviese una desviación estándar por debajo de 0,33 entre duplicados y entre ambas diluciones de las curvas de calibración y sus resultados iniciales.

Dado que ambos genes housekeeping estaban altamente correlacionados (coeficiente de correlación Spearman:  $r = 0,82$ ;  $p < 0,000$ ), todos los resultados se normalizaron con YWHAZ. Se utilizaron curvas estándar para estimar el número de copias normalizado (C<sub>nn</sub>) de PTTG, IGF1R, VEGF y KDR.

#### V.2.4.2.2. Segunda fase: Estudio en muestras congeladas.

##### 1. Extracción ARN y microRNA:

Se extrajo el ARN total a partir de fragmentos de tejido tratados con RNA-later y almacenados a -20°C, obtenidos de las zonas representativas del tumor revisadas por un anatomopatólogo. Todos los experimentos se llevaron a cabo tanto en los casos problema como en hipófisis normales (tratados del mismo modo) y en un control comercial de ARN total de cerebro.

Los fragmentos de tejido fueron rotos, lisados y homogeneizados de manera eficiente mediante TissueLyser® (Qiagen) y el buffer correspondiente. Se realizó la extracción con el AllPrep ADN/RNA/Protein Mini Kit® (Qiagen) seguido de una extensión del protocolo para rescatar a los microRNAs de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN total se procesó con RNase-Free DNase Set® (Qiagen) según el protocolo de extracción. Se evaluó la calidad y cantidad de ARN total y los microRNAs por bioanálisis en el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Una vez extraídos, el ARN total y los microRNAs se preservarán a -80°C hasta su retrotranscripción.

##### 2. Análisis de patrones de expresión génica y miRNA:

La RT-PCR se realizó con el RevertAid First Strand cADN Synthesis Kit® (Thermo Scientific). Para el análisis de la expresión de microRNAs, la RT-PCR se

realizó utilizando el TaqMan MicroARN Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems) con el RT-Primers pool, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La técnica de elección para la cuantificación de los niveles de expresión fue la PCR cuantitativa. Este procedimiento se basa en la amplificación exponencial del cADN de interés en presencia de sondas fluorescentes específicas que se unen al fragmento a amplificar. La cuantificación de la fluorescencia generada al degradarse la sonda por la actividad exonucleasa de la polimerasa, permite una cuantificación relativa de la cantidad inicial de copias del cADN en cuestión.

Se analizaron los ensayos TaqMan de expresión de los genes c-myc, E2F1 y PTTG (véase Tabla V.2-1), así como de los genes housekeeping YWHAZ y GAPDH (controles endógenos) con la mezcla de reacción TaqMan FAST Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para la cuantificación de miRNAs, se utilizó la TaqMan® Universal Master Mix II No UNG y los ensayos específicos TaqMan para pri-miR-17-92, miR-17-5p, miR20a, miR-16-1, miR-15a y Let-7a (véase Tabla V.2-1), así como los ensayos de RNU44 y RNU49 miRNAs, que se utilizaron como controles endógenos ya que se expresan de forma estable (Applied Biosystems).

**Tabla V.2-1. Ensayos de Expresión TaqMan empleados en la cuantificación mediante RT-PCR (Life Technologies).**

**Table 3. TaqMan Expression Assays Elegidos (Life Technologies)**

<b>Gen</b>	<b>TaqMan® Gene Expression Assays</b>
PTTG	Hs00851754_u1
E2F1	Hs00153451_m1
cMYC	Hs00153408_m1
Ki-67	Hs01032443_m1
Pri-miR~17-92	Hs03295901_pri
<b>Housekeeping</b>	
ACTB	Hs99999903_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
YWHAZ	Hs00237047_m1
<b>microRNA</b>	<b>TaqMan® miRNA Expression Assays</b>
Hsa-miR-17-5p	002308
Hsa-miR-20a	000580
Hsa-miR-16-1	002420
Hsa-miR-15a	000389
Hsa-miR-let-7a	000377
<b>snRNA</b>	
RNU43	001095
U54	001210

Todos los análisis se realizaron por duplicado y siguiendo el mismo protocolo. Las muestras de hipófisis normales procedentes de autopsia se mezclaron en partes iguales en una placa que se analizó como calibrador. Los análisis se realizaron en volúmenes de reacción de 10 µl que contenía 5 µl de TaqMan Fast Advanced Master Mix® (Life Technologies), 0.5 µl de TaqMan Gene o miRNA Expression Assay® (Life Technologies), y 2.5 µl de calibrador en el 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Se analizaron mediante SDS Software® (Applied Biosystems) y el análisis de la fluorescencia generada se realizó mediante el software SDS. La cuantificación relativa (RQ) se estableció con base en el método  $\Delta\Delta C_t$  en unidades de cambio veces (FC) (Applied Biosystems, boletín Usuario # 2). La expresión génica y de miRNA se clasificó como expresión reprimida ( $RQ \leq 0,5 FC$ ), similar a la fisiológica ( $0,5 CF < RQ < 1,5 FC$ ) o sobreexpresión ( $RQ \geq 1.5FC$ ) para el análisis estadístico.

### 3. Clasificación subtipos de adenoma hipofisario.

Dado que las muestras procedían de centros distintos y no se pudo centralizar el estudio IHQ de las mismas, se realizó una clasificación molecular de los subtipos de AH (Tabla V.2-2).

**Tabla V.2-2. Clasificación molecular de los Adenomas Hipofisarios según el patrón génico de expresión y presentación clínica.**

Subtipo AH	Expresión dominante	Presentación Clínica
<b>Gonadotropos (GT)</b>	FSH, LH or $\alpha$ -subunidad	
FSHomas	FSH	No funcionante
LHomas	LH	
Mixed	Combinación de FSH, LH y $\alpha$ -sub	
<b>Corticotropos (CTF)</b>	POMC, AVPR1 y CRH-R1	Síndrome de Cushing
<b>Corticotropos Silentes (CTS)</b>	POMC, AVPR1 y CRH-R1	No funcionante
<b>Somatotropos (ST)</b>	GH	Acromegalia
<b>FSH: Hormona Foliculo Estimulante; LH: Hormona Luteal; CGA: Gen codificante de subunidad alfat; POMC: Proopiomelanocortina; GH: Hormona del Crecimiento), AVPR1b: Receptor de Vasopresin 1b; CRH-R1: Receptor de la Hormona Liberadora de Corticotropina1.</b>		

Realizamos un análisis de expresión de 26 genes hormonales y de receptores implicados en los distintos tipos celulares hipofisarios en la serie de 172 tumores recogidos en el Nodo de Alicante del proyecto REMAH

Basándonos en los casos con un diagnóstico de subtipo de adenoma clínico, bioquímico y anatomopatológico concordante, se establecieron los rangos de expresión de cada gen estudiado con los percentiles 25 y 75 para cada subtipo (Tabla V.2-3). Los casos que presentaban expresión de varios genes hormonales y no eran funcionantes clínicamente se clasificaron en función de la expresión dominante, estableciendo como “patrón oro” el p25 del gen dominante en la muestra completa.

**Tabla V.2-3. Rangos de expresión relativa (percentiles 25-75) de los genes estudiados según el subtipo de adenoma hipofisario.**

Subtipo AH	FSH	LH	CGA	GH	POMC	AVPR1b	CRHR1
<b>GT</b>	0.19-4.95	0.00-0.09	0.00-0.06	0.00-0.00	0.00-0.00	0.00-0.05	0.04-0.28
FSHomas	0.69-7.03	0.00-0.02	0.00-0.03	0.00-0.00	0.00-0.00	0.00-0.06	0.03-0.32
LHomas	0.00-0.07	0.03-0.13	0.00-0.05	0.00-0.00	0.00-0.03	0.00-0.03	0.00-0.11
Mixed	0.05-0.55	0.01-0.15	0.01-0.15	0.00-0.00	0.00-0.00	0.00-0.05	0.00-0.24
<b>CTF</b>	0.00-0.01	0.00-0.00	0.00-0.02	0.00-0.00	0.73-6.30	18.38-53.40	1.39-50.79
<b>CTS</b>	0.00-0.05	0.00-0.00	0.00-0.17	0.00-0.00	0.02-7.41	23.10-110.61	0.34-51.50
<b>ST</b>	0.00-0.10	0.00-0.01	0.00-0.14	0.64-3.15	0.00-0.03	0.02-0.28	0.00-0.48

Subtipo AH (GT: gonadotropo, CTF: corticotropo, CTS: corticotropo silent, ST: somatotropo). Hormonas hipofisarias (FSH: Hormona Foliculo Estimulante; LH: Hormona Luteal; CGA: Gen codificante de subunidad alfa; POMC: Proopiomelanocortina (precursor ACTH); GH: Hormona del Crecimiento), y receptores involucrados en la síntesis y secreción de ACTH (AVPR1b: Receptor de Vasopresin 1b; CRHR1: Receptor de la Hormona Liberadora de Corticotropina1).

#### 4. Expresión génica de Ki67

Del mismo modo, al proceder las muestras de centros distintos y no centralizar el estudio inmunohistoquímico, se decidió evaluar la expresión génica de Ki67 mediante fold change (FC).

Se realizó una curva COR para definir el FC de Ki67 correspondiente con una determinación inmunohistoquímica de Ki67 mayor de 3%. Se consideró el mayor área

bajo la curva para la expresión génica 2.59 FC de Ki-67, con una sensibilidad de 85,5% y especificidad de 77,6%.

Este límite de expresión génica de Ki-67 detecta los casos clásicamente considerados como peor pronóstico ( $Ki-67 \geq 3\%$  y grado de Hardy IV) con una sensibilidad de 100% y especificidad de 75,5%.

### **V.3. Aspectos éticos y de confidencialidad de datos**

Ambas fases de la investigación fueron aprobadas por parte del Comité Ético de Investigación Clínica del HGUA.

En la primera fase del estudio se entregó un consentimiento informado específico del estudio a realizar, mientras que los pacientes que formaron parte de la segunda fase del estudio firmaron el consentimiento informado aceptando la conservación de muestras de AH en la Red de Biobancos de la Comunidad Valenciana con fines de investigación.

Las bases de datos empleadas se encuentran anonimizadas, identificándose los pacientes por número de registro.

### **V.4. Análisis estadístico**

La base de datos original de la Unidad de Patología Hipofisaria se realizó en el programa Access 2000. Desde este programa los datos fueron importados al programa estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

La descripción de los datos se ha hecho mediante recuentos absolutos y relativos en el caso de las variables cualitativas, utilizando tablas de frecuencia y gráficos. Las variables cuantitativas se han descrito mediante estadísticos de tendencia central (media y mediana) y sus correspondientes medidas de dispersión [desviación estándar y rango intercuartílico (P25-75)] según siguieran o no una distribución normal. Para verificar la normalidad de una distribución se utilizó el test de Kolmogórov-Smirnov, considerando que los resultados  $p < 0,05$  no seguían una distribución normal.

Para la comparación de las variables continuas, si seguían la distribución normal, se utilizó el test de t-Student para dos muestras independientes y el test de ANOVA para tres o más muestras independientes.

Para la comparación de las variables continuas, si no seguían una distribución normal, se utilizó el test no paramétrico de U de Mann-Whitney para dos muestras independientes y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para tres o más muestras independientes.

Para la comparación de variables categóricas se utilizó la  $\chi^2$  con la corrección de Yates o la prueba exacta de Fisher cuando no se cumplían las condiciones para aplicar la prueba de la  $\chi^2$ .

La magnitud de la asociación de las variables relacionadas se evaluó mediante la odds ratio (OR) con el intervalo de confianza del 95% (IC95%).

Se realizó curva COR para determinar el punto de corte óptimo de PTTG en relación con invasividad y progresión en el estudio con muestras en parafina, y para fijar el valor del FC de Ki67 que determinase un mayor riesgo de tumores con peor pronóstico en el estudio con muestras congeladas.

La asociación de las variables de resultado con las variables explicativas se ajustó por aquellas variables que fueron significativas en el análisis univariante, mediante un sistema de análisis de regresión logística múltiple para eliminar la interrelación entre las variables en la segunda fase del estudio.

Se realizó el análisis de supervivencia Kaplan-Meier y el test long-rank para comparar las curvas de intervalo libre de progresión de enfermedad en cuanto al crecimiento de restos tumorales de la muestra en parafina.

Para el contraste de las hipótesis descritas anteriormente se consideró significativo un valor de p menor de 0,05.







## **VI. RESULTADOS**

## VI.1. Primera fase. Muestras conservadas en parafina.

### VI.1.1. Descripción de la muestra

En el estudio con muestras en parafina se incluyeron 46 casos de AH que cumplían los criterios de inclusión y exclusión de las 133 muestras que se recogieron durante el período de estudio en el HGUA. Las características de los pacientes se describen en la tabla VI.1-1.

**Tabla VI.1-1. Características basales de los pacientes incluidos en la primera fase de estudio (N=46).**

<b>Características basales.</b>	
<b>Edad (años)</b>	53 ± 15
<b>Hombres</b>	25 (54%)
<b>Mujeres</b>	21 (46%)
<b>Diámetro máximo (mm)</b>	30 ± 16
<b>Clasificación Inmunohistoquímica de los adenomas</b>	
<b>gonadotropos</b>	27 (58,7%)
<b>somatotropos</b>	10 (21,7%)
<b>corticotropos</b>	4 (8,7%)
<b>lactotropos</b>	3 (6,5%)
<b>tirotrofo</b>	1 (2,2%)
<b>nulo</b>	1 (2,2%)
<b>Clasificación funcional</b>	
<b>Adenomas funcionantes</b>	13 (28,3%)
<b>Adenomas no funcionantes</b>	33 (71,7%)
<b>Extensión según la clasificación de Hardy</b>	
<b>Grados I-II</b>	4 (8,9%)
<b>Grados III-IV</b>	41 (91,9%)
<b>Tratamientos prequirúrgicos</b>	
<b>agonistas dopaminérgicos</b>	3
<b>análogos de somatostatina</b>	5
<b>Datos expresados como media ± desviación estándar ó número absoluto y %</b>	

La clasificación según la funcionalidad de los AH se realizó con base a la clínica del paciente y a los datos bioquímicos de hipersecreción hormonal. Se consideraron funcionantes 10 (100%) ST, 1 (100%) TT, 1 (33%) LT y 1 (25%) CT. El resto de los tumores fueron considerados no funcionantes.

El 60% de los pacientes presentaba invasión difusa en el momento de la intervención quirúrgica (grado IV de Hardy). En cuanto a la afectación de estructuras adyacentes: 25 (55,6%) invadían seno cavernoso, 10 (22,2%) afectaban al seno esfenoidal y 34 (75,6%) presentaban compresión del quiasma óptico.

La mitad de los pacientes con acromegalia recibieron tratamiento con análogos de somatostatina de forma previa a la intervención. Sólo uno de los pacientes con prolactinoma fue tratado previamente con agonistas dopaminérgicos. En cuanto al resto de tratamientos con agonistas dopaminérgicos, afectaban a un paciente con ST y un GT.

Para realizar el estudio de progresión o crecimiento de restos tumorales, revisamos la evolución de 14 pacientes que no recibieron tratamientos adyuvantes (médico ni radioterapia). El seguimiento medio fue de  $46 \pm 36$  meses. Las características clínicas, anatomopatológicas y moleculares de estos pacientes se muestran en la tabla VI.1-2.

**Tabla VI.1-2. Características clínicas, anatomopatológicas y expresión génica de PTTG de los pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante tras la intervención.**

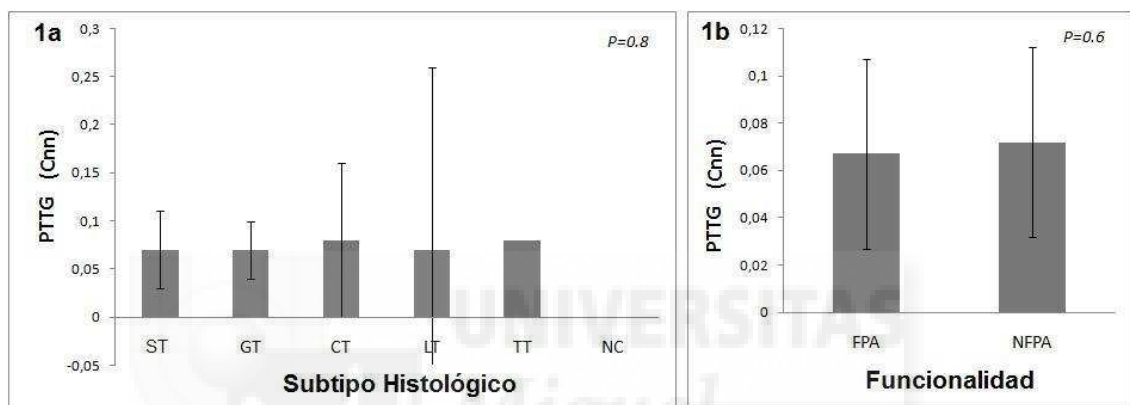
<b>Características clínicas de los pacientes sin terapias adyuvantes tras la intervención.</b>								
N	Edad/ Sexo	Subtipo histológico	Diámetro tumoral máximo (mm)	Resto tumoral tras la intervención	Seguimietno (meses)	Tiempo libre de progresión (meses)	Ki-67 (%)	PTTG (Cnn)
1	34/♀	GT	15	Sí	60	11	1.0	0.042
2	70/♀	GT	22	Sí	30	12	0.5	0.086
3	71/♂	GT	20	Sí	36	21	2.2	0
4	67/♀	GT	20	Sí	108	23	1.2	0
5	64/♂	GT	32	Sí	48	37	1.0	0.101
6	67/♂	GT	30	Sí	52	37	2.3	0.176
7	70/♂	GT	50	Sí	88	53	2.3	0
8	43/♂	GT	43	Sí	114	-	0.8	0.038
9	72/♂	GT	28	Sí	3	-	2.0	0
10	50/♀	LT	45	Sí	67	-	1.5	0
11	72/♀	GT	15	Sí	20	-	4.5	0.152
12	67/♀	GT	50	Sí	39	-	1.2	0.097
13	36/♀	ST	42	No	24	-	1.2	0.064
14	63/♀	GT	46	Sí	6	-	1.5	0.089

GT: adenoma gonadotropo; LT: adenoma lactotropo; ST: adenoma somatotropo.

### VI.1.2. *Expresión de PTTG según el subtipo de adenoma hipofisario*

No encontramos diferencias en la expresión de ARNm de PTTG entre los distintos subtipos de adenoma hipofisario (Figura VI.1-1).

**Figura VI.1-1. Expresión de ARNm de PTTG como número de copias normalizadas (Cnn) según el subtipo histológico de adenoma hipofisario (1a) y el estado funcional (1b).**



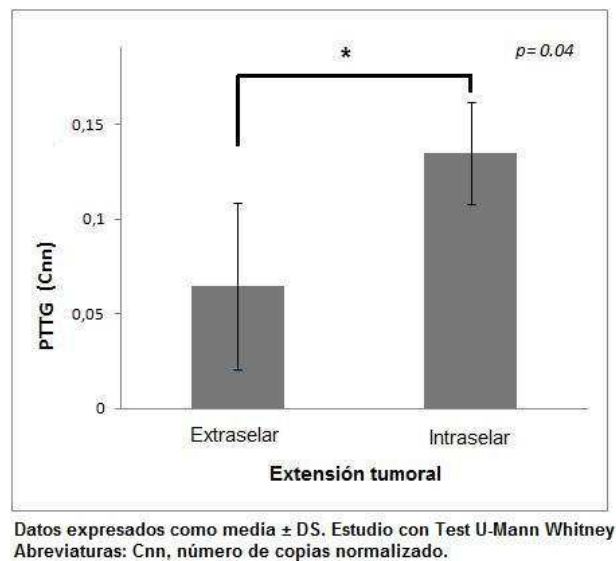
Datos mostrados como media  $\pm$  desviación estándar. Test no-paramétricos Kuskal-Wallis y U-Mann Whitney. Abreviaturas: ST, adenomas somatotropos; GT, adenomas gonadotropos; CT, adenomas corticotropos; LT, adenomas lactotropos; TT, adenomas tirotropos; NC, adenomas nulos; FPA, adenomas funcionantes; NFPA, adenomas no-funcionantes.

### VI.1.3. *Asociación entre la expresión de PTTG y la extensión tumoral*

#### VI.1.3.1. **Muestra global**

Los pacientes con extensión extraselar presentaban menor expresión de PTTG que aquellos con extensión intraselar (0,065 [P25-P75: 0,000-0,089] Cnn vs. 0,135 [0,105-0,159] Cnn,  $p=0,04$ ) (Figura VI.1-2).

**Figura VI.1-2. Comparación de la expresión de PTTG como número de copias normalizadas (Cnn) entre adenomas hipofisarios extra e intraselares.**



Mediante análisis COR se identificó un punto de corte de expresión de PTTG de 0,129 Cnn para predecir extensión extraselar con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 85%. Los casos con expresión menor de 0,129 Cnn de PTTG presentaban un riesgo 17,5 (IC95: 1,6-197,4;  $p = 0,021$ ) veces mayor de extensión extraselar que aquellos tumores que expresaban un mayor número de copias de PTTG.

No encontramos diferencias en la extensión tumoral en relación con las variables clínicas, tales como sexo, edad o tiempo de evolución; ni con Ki67.

### **VI.1.3.2. Según funcionalidad**

Se evidenció una tendencia en los adenomas funcionantes con extensión extraselar a una menor expresión de PTTG (Cnn) [0,042 (0 – 0,073) vs. 0,182 (0,128 – 0,189),  $p=0,077$ ]. Dicha tendencia no se objetivó en los adenomas no funcionantes.

### **VI.1.3.3. Según subtipo histológico**

Todos los GT presentaban una extensión extraselar, por lo que no procede el estudio.

3/4 CT eran extraselares, sin evidenciar diferencias en cuanto a la expresión de ARNm de PTTG en función de la extensión. Dentro de los adenomas ST, 7/10 presentaban extensión extraselar, sin diferencias en cuanto a la expresión de ARNm de PTTG o el índice Ki67 en función de la extensión.

#### VI.1.4. Asociación entre la expresión de PTTG y la invasión de estructuras adyacentes

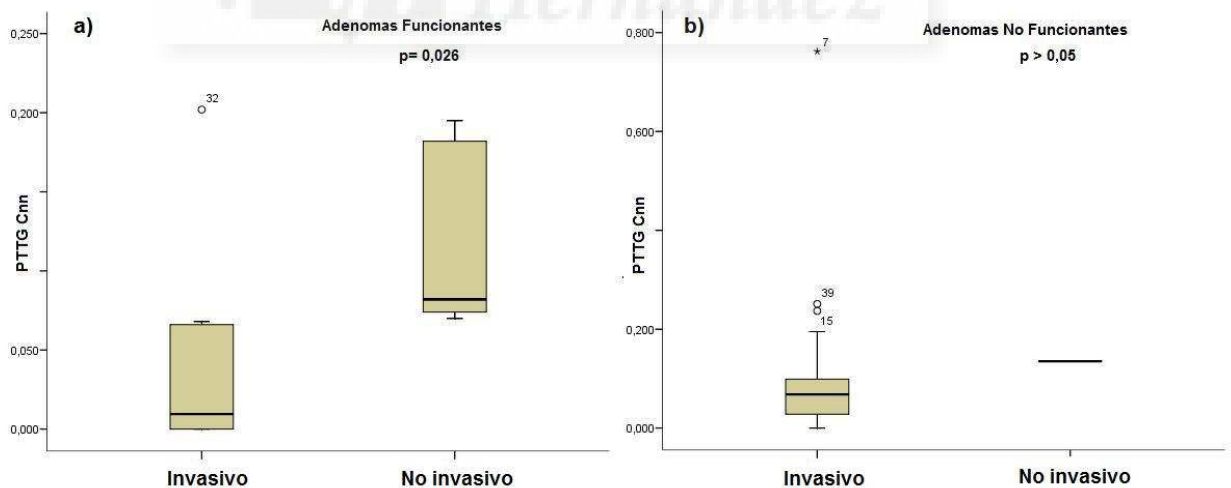
##### VI.1.4.1. Muestra global

Los tumores invasivos presentaban menor expresión de PTTG que aquellos no invasivos (0,064 [0,000-0,093] Cnn vs. 0,082 [0,074-0,135] Cnn,  $p=0,049$ ). No se encontraron diferencias en cuanto a la invasión tumoral en relación con las variables clínicas, tales como sexo, edad o tiempo de evolución; así como tampoco con Ki67.

##### VI.1.4.2. Según funcionalidad

Los adenomas funcionantes con invasión de estructuras adyacentes expresaban menor ARNm de PTTG que aquellos no invasivos (0,001 [0 - 0,067] Cnn vs. 0,082 [0,072 - 0,189] Cnn,  $p=0,026$ ). Estas diferencias no se encontraron en los adenomas no funcionantes, en los que sólo uno de ellos era no invasivo (Figura VI.1-3).

**Figura VI.1-3. Comparación de la expresión de PTTG (Cnn) entre adenomas hipofisarios invasivos o no invasivos: (a) adenomas funcionantes; (b) adenomas no funcionantes.**



### **VI.1.4.3. Según el subtipo histológico**

Todos los GT eran invasivos, por lo que no procede el estudio.

Dentro de los CT 3/4 eran invasivos, sin diferencias en cuanto a la expresión de ARNm de PTTG. 5/10 adenomas ST presentaban invasión de estructuras adyacentes, no evidenciando diferencias en cuanto a la expresión de ARNm de PTTG en función de la misma.

### **VI.1.5. Asociación entre la expresión de PTTG y la agresividad tumoral**

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de PTTG en función del grado de agresividad tumoral al estudiar la muestra de forma global o por subtipos.

### **VI.1.6. Asociación entre la expresión de PTTG y el crecimiento de restos tumorales**

Durante el seguimiento, 7 de los 14 pacientes sin tratamientos adyuvantes tras la cirugía presentaron crecimiento del resto tumoral mayor del 20% en alguno de los diámetros medidos. En todos los casos se trataba de tumores GT con extensión extraselar. Los tumores con crecimiento presentaban menor tamaño al diagnóstico ( $27 \pm 11$  vs.  $42 \pm 8$  mm;  $p=0,019$ ).

La expresión de ARNm de PTTG no se asoció con la progresión tumoral [crecimiento: 0,064 (0 – 0,120) vs. No crecimiento: 0,032 (0 – 0,105);  $p > 0,05$ ]. Aquellos tumores que no expresaban PTTG presentaron una tendencia a un mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad ( $32,3 \pm 10,3$  vs.  $24,3 \pm 7,36$  meses,  $p=0,068$ ).



**VI.1.7. *Modificación de la expresión de PTTG por el tratamiento médico previo***

No se encontraron diferencias en la expresión de PTTG entre los pacientes que recibieron tratamiento médico previo a la intervención y los que no lo recibieron ( $p > 0,05$ ).

Al estudiar por separado al subtipo de ST, tampoco se evidenciaron diferencias entre aquellos pacientes con y sin tratamiento previo con SSA ( $p > 0,05$ ).



## VI.2. Segunda fase. Muestras congeladas

Uno de los objetivos principales de nuestra línea de investigación fue valorar la regulación de PTTG en función del subtipo de AH, para lo cual se diseñó una segunda fase del estudio en la que se seleccionaron casos de cuatro subtipos de AH (GT, CTF, ST y CTS).

### VI.2.1. Descripción de la muestra

Se seleccionaron 60 muestras de AH de la colección recogida en el nodo de Alicante procedentes del proyecto REMAH. La serie se componía de 29 adenomas gonadotropos (GT), 15 adenomas somatotropos (ST), 8 corticotropinomas funcionantes (CTF) y 8 corticotropinomas silentes (CTS).

Las características de los pacientes incluidos en el estudio se recogen en la tabla VI.2-1.

**Tabla VI.2-1. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio con muestras congeladas (N= 60).**

Características basales estudio con muestras congeladas				
Edad (años)	54 ± 15	Extensión (Hardy)		59/60
Hombre	27/60 (45%)	<b>No Invasivo</b>	Intraselar (I-II)	18/59 (30,5%)
Diámetro tumoral máximo (mm)	22,51±10,92		Extraselar (III)	10/59 (17,0%)
Radioterapia	0	<b>Invasivo</b>	Invasivo (IV)	31/59 (52,5%)
Segunda intervención	12/60 (20%)			
<b>Tratamiento médico Pre-quirúrgico</b>				
<b>Adenomas ST</b>	12/15 (80%)	<b>Adenomas CTF</b>		5/8 (62,5%)
	SSA	7	KET	3
	AD	1	KET + AD	2
	Peg	1	<b>Adenomas CTS</b>	AD
	SSA + Peg	3	<b>Adenomas GT</b>	AD
				2/28 (7%)
Datos mostrados como media ± DS o número/total (%). ST: somatotropo, CTF: corticotropo, CTS: corticotropo silente, GT: gonadotropo, SSA: análogos somatostatina, AD: agonista dopaminérgico, Peg: Pegvisomant , KET: Ketoconazol.				

Las muestras procedentes de adenomas reintervenidos se trataban de 3 adenomas ST y 9 adenomas GT. La mayoría de los tumores funcionantes recibieron tratamiento médico de forma previa a la intervención (17/23).

Se encontraron diferencias en cuanto la extensión tumoral según los diferentes subtipos de AH tal y como se muestra en la tabla VI.2-2 ( $\chi^2$ ,  $p = 0,000$ ).

**Tabla VI.2-2. Extensión tumoral según el subtipo de adenoma hipofisario.**

Extensión tumoral según el subtipo de adenoma hipofisario.					
	CTF	ST	GT	CTS	Total
Intraselar (I-II)	6 (75%)	9 (60%)	1 (3,5%)	2 (25%)	18
Extraselar (III)	0	0	7 (25%)	3 (37,5%)	10
Invasivo (IV)	2 (25%)	6 (40%)	20 (71,5%)	3 (37,5%)	31
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>15</b>	<b>28</b>	<b>8</b>	<b>59</b>

Datos mostrados como número absoluto y porcentaje respecto a subtipo histológico.  
Abreviaturas: ST, somatotropo; CTF, corticotropo; CTS, corticotropo silente; GT, gonadotropo.

Los tumores se agruparon en función del grado de agresividad previamente definido como: 5 (9,3%) alto; 26 (48,1%) medio y 23 (42,6%) bajo. No existían diferencias en cuanto al grado de agresividad entre subtipos de AH ( $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ) (Tabla VI.2-3).

**Tabla VI.2-3. Grado de agresividad según el subtipo de adenoma hipofisario.**

Grado de agresividad tumoral según el subtipo de adenoma hipofisario.					
	CTF	ST	GT	CTS	Total
<b>Alto</b>	0	2 (15,4%)	2 (7,4%)	1 (16,7%)	5 (9,3%)
<b>Medio</b>	4 (50,0%)	4 (30,8%)	17 (63,0%)	1 (16,7%)	26 (48,1%)
<b>Bajo</b>	4 (50,0%)	7 (53,8%)	8 (29,6%)	4 (66,7%)	23 (42,6%)
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>27</b>	<b>6</b>	<b>54</b>

Datos mostrados como número absoluto y porcentaje respecto a subtipo histológico.  
Abreviaturas: ST, somatotropo; CTF, corticotropo; CTS, corticotropo silente; GT, gonadotropo.

### VI.2.2. *Expresión de PTTG según el subtipo molecular de adenoma hipofisario*

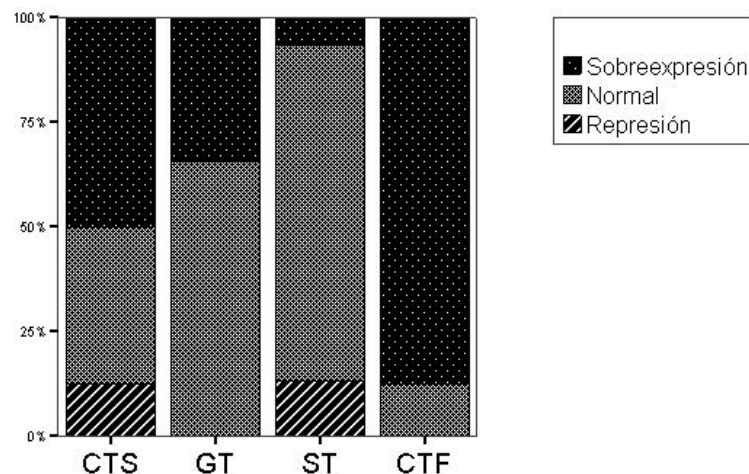
PTTG se expresó en todos los subtipos de AH, existiendo diferencias en cuanto a su expresión dependiendo del subtipo (Tabla VI.2-4). Además el patrón de expresión

fue diferente según el subtipo, encontrando sobreexpresión en 87,5% (7/8) de los adenomas CTF, 50% (4/8) de los adenomas CTS, 34,5% (10/29) de GT y 6,7% (1/15) de los adenomas ST ( $\chi^2$  p=0,008) (Figura VI.2-1).

**Tabla VI.2-4. Expresión de PTTG (fold change) en función del subtipo de adenoma hipofisario.**

Subtipo de AH	PTTG FC
Todos en conjunto	1,17 (0,85-2,23)
GT	1,06 (0,82-1,74)
CTF	2,69 (1,86-6,04)
CTS	2,14 (0,67-3,84)
ST	1,08 (0,82-1,30)
p (K-W)	<b>0,006</b>
Datos mostrados como mediana (P25-72) de fold change (FC). Abreviaturas: ST, somatotropo; CTF, corticotropo; CTS, corticotropo silente; GT, gonadotropo.	

**Figura VI.2-1. Diferente patrón de expresión de PTTG en función del subtipo de adenoma hipofisario.**



Abreviaturas: CTS, corticotropo silente; GT, gonadotropo; ST, somatotropo; CTF, corticotropo funcionante.

### VI.2.3. *Asociación de la expresión de PTTG con la extensión tumoral*

No se encontraron diferencias en la expresión de PTTG (FC) según la extensión intra o extraselar al valorar la muestra de AH, tanto en conjunto como dividida en subtipos moleculares.

En el subtipo de adenoma CTF se evidenció una correlación negativa entre el tamaño tumoral máximo y la expresión de ARNm de PTTG (R Spearman = 0,778,  $p=0,028$ ).

### VI.2.4. *Asociación de la expresión de PTTG con la invasión de estructuras adyacentes*

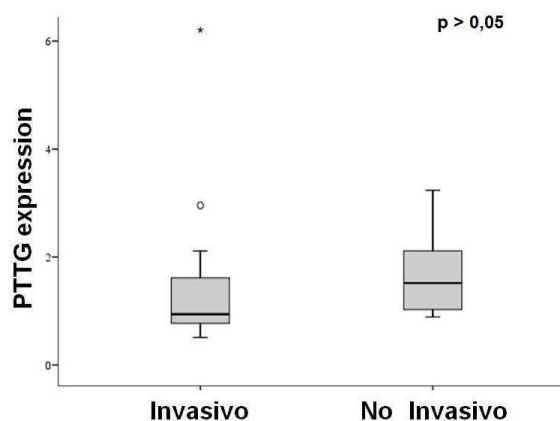
#### VI.2.4.1. Muestra global

En el conjunto de AH estudiados se encontró una tendencia a menor expresión de PTTG en los adenomas invasivos frente a los no invasivos [1,06 (0,81 – 2,05) vs. 1,38 (0,97 – 2,65);  $p = 0,09$ ].

#### VI.2.4.2. Según el subtipo molecular

En el subtipo de adenomas GT se evidenció una tendencia a menor expresión de PTTG en los adenomas invasivos frente a no invasivos [0,94 (0,77-1,61) vs 1,52 (1,03-2,12); UMW  $p= 0,084$ ] (Figura VI.2-2). Los subtipos de adenoma ST, CTF y CTS no mostraban diferente expresión de PTTG según la invasividad.

**Figura VI.2-2. Diferente expresión de PTTG (FC) en función de la invasividad tumoral en los adenomas gonadotropos.**

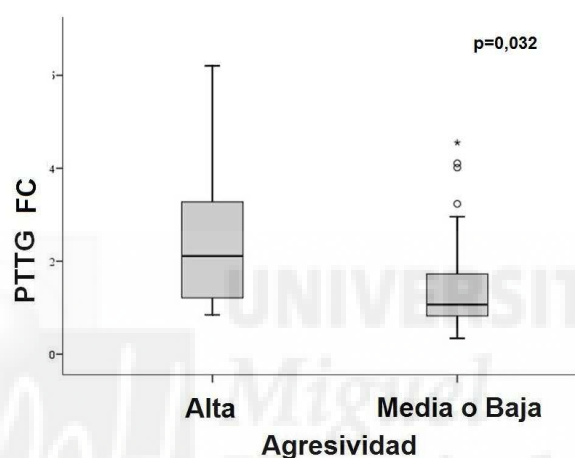


### VI.2.5. *Asociación entre la expresión de PTTG y el grado de agresividad tumoral*

#### VI.2.5.1. **Muestra global**

Los tumores con un grado alto de agresividad se caracterizaban por una expresión mayor de PTTG que aquellos adenomas con un grado de agresividad medio o bajo [alto: 2,11 (1,21-3,28); medio o bajo: 1,07 (0,82-1,73); UMW  $p=0,032$ ] (Figura VI.2-3).

**Figura VI.2-3. Diferente expresión de PTTG (FC) en función del grado de agresividad en la muestra global de adenomas hipofisarios.**



#### VI.2.5.2. **Según el subtipo molecular**

Los adenomas GT mostraron diferente expresión de PTTG en función del grado de agresividad (K-W,  $p=0,024$ ). Se evidenció una tendencia a que los adenomas con agresividad baja expresasen mayor ARNm de PTTG que aquellos con agresividad media-alta [2,18 (1,25 – 3,39) FC vs. 1,23 (1,02 – 2,24) FC; UMW  $p=0,056$ ].

Los subtipos de adenoma ST, CTF y CTS no mostraban diferente expresión de PTTG según el grado de agresividad.

### VI.2.6. *Modificación en la expresión de PTTG por el tratamiento médico previo a la intervención quirúrgica*

La expresión de PTTG fue menor en los AH tratados con SSA al estudiar la muestra en conjunto [tratados: 0,95 (0,43 - 1,11) vs no tratados: 1,34 (0,88-3,85) FC, UMW  $p=0,04$ ], pero esta significación estadística se perdía al diferenciar por subtipos.

El tratamiento previo con AD no modificó la expresión de PTTG ni en la muestra global ni en los diferentes subtipos.

#### VI.2.7. *Expresión de E2F1, c-myc y Pri-miR-17~92 en función del subtipo molecular de adenoma hipofisario*

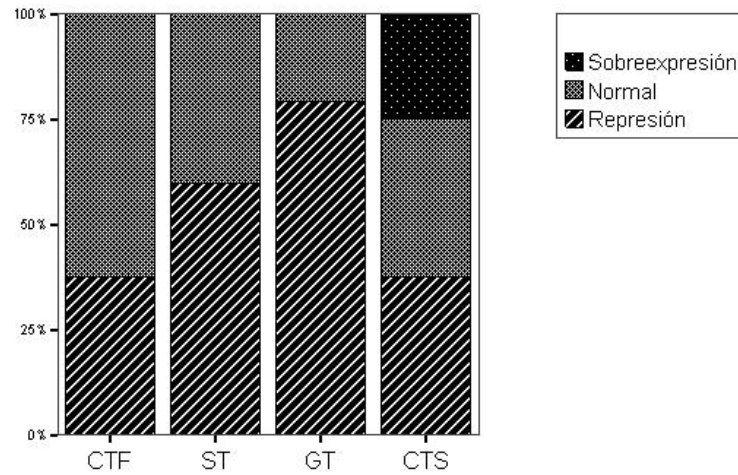
La expresión de E2F1 y c-myc fue diferente según el subtipo de AH, tal y como se muestra en la tabla VI.2-5.

**Tabla VI.2-5. Expresión génica de E2F1, c-myc y Pri-miR-17~92 en los diferentes subtipos de adenomas hipofisarios.**

Subtipo	E2F1	c-myc	Pri-miR-17~92
<b>Todos en conjunto</b>	2,09 (1,16-3,78)	0,32 (0,11-0,64)	0,12 (0,08-0,27)
<b>GT</b>	3,03 (1,97-4,14)	0,17 (0,07-0,43)	0,11 (0,07-0,26)
<b>CTF</b>	1,32 (1,17-2,09)	0,59 (0,43-1,06)	0,13 (0,08-0,25)
<b>CTS</b>	3,45 (0,87-5,03)	0,70 (0,22-2,35)	0,22 (0,10-0,33)
<b>ST</b>	0,96(0,68-1,44)	0,28 (0,12-0,55)	0,12 (0,09-0,45)
<b>p (K-W)</b>	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>	<b>0,421</b>
Datos mostrados como mediana (P25-72) de fold change.			
Abreviaturas: ST, somatotropo; CTF, corticotropo; CTS, corticotropo silente; GT, gonadotropo.			

El oncogen c-myc se sobreexpresó sólo en los tumores CTS (2/8, 25%). El resto de los adenomas CTS (6/8, 75%) y 5/8 de los CTF (62,5%) presentaban expresión normal de c-myc. La expresión de este oncogen se encontraba suprimida en los subtipos GT y ST (23/29 (79,3%) y 9/15 (60%), respectivamente). Las diferencias en el patrón de expresión de c-myc fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2$  p=0,003) (Figura VI.2-4).

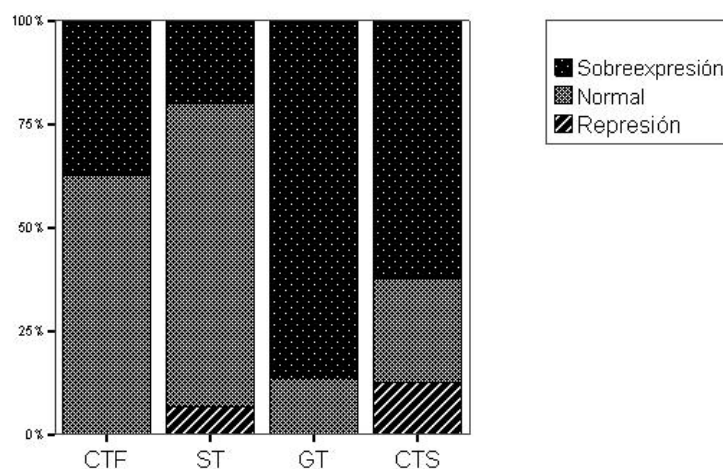
**Figura VI.2-4. Tabla de frecuencias con el patrón de expresión de c-myc (sobreexpresión, expresión normal y represión) en función del subtipo molecular de adenoma hipofisario.**



Abreviaturas: CTF, corticotropo funcional; ST, somatotropo; GT, gonadotropo; CTS, corticotropo silente

El factor de transcripción E2F1 se sobreexpresó en 25/29 (86,2%) de los adenomas GT y en 5/8 (62,5%) de los CTS. Los niveles de expresión en los subtipos CTF y ST fueron normales en 5/8 (62,5%) y 12/15 (80%), respectivamente. Estas diferencias en el patrón de expresión de E2F1 según el subtipo de AH fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2$  p=0,001) (Figura VI.2-5).

**Figura VI.2-5. Tabla de frecuencias con el patrón de expresión de E2F1 (sobreexpresión, expresión normal y represión) en función del subtipo molecular de adenoma hipofisario.**



Abreviaturas: CTF, corticotropo funcional; ST, somatotropo; GT, gonadotropo; CTS, corticotropo silente



## VI.2.8. Asociación de E2F1 y c-myc con las características clínicas del tumor hipofisario

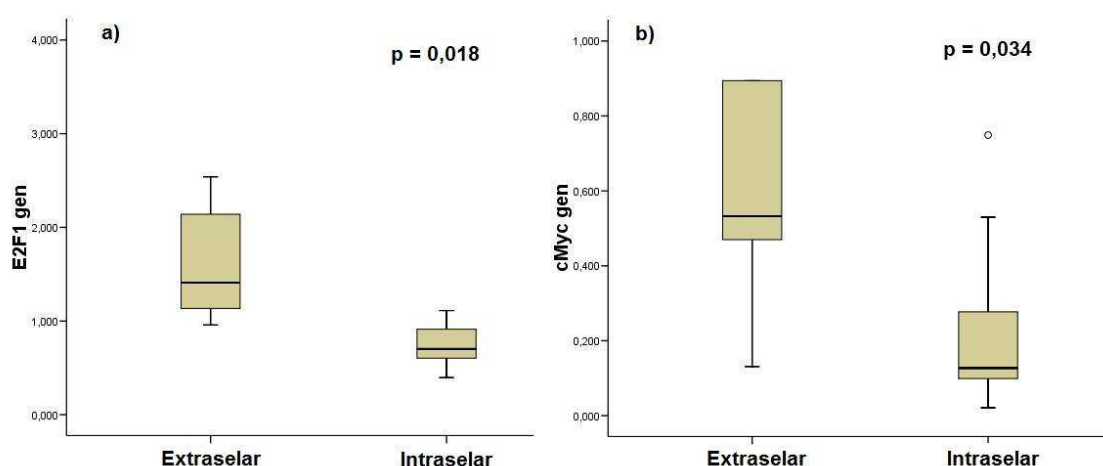
### VI.2.8.1. Extensión tumoral

En la muestra global, el diámetro máximo se correlacionó de forma positiva con la expresión de E2F1 ( $r=0,353$ ;  $p=0,027$ ). La expresión de este gen fue mayor para los adenomas extraselares que para los adenomas intraselares: 2,51 FC (1,44-3,94) vs 1,14 FC (0,70-1,74), respectivamente (UMW:  $p=0,001$ ).

Al estudiar los diferentes subtipos, en los adenomas GT el diámetro máximo se correlacionó de forma negativa con la expresión de E2F1 ( $r= -0,55$ ,  $p= 0,003$ ).

Los adenomas ST con extensión extraselar mostraron una mayor expresión de E2F1: 1,41 FC (1,09-2,24) vs 0,70 FC (0,57-1,01), respectivamente (UMW:  $p=0,018$ ). Este subtipo mostró además una correlación positiva entre la expresión de c-myc y el diámetro máximo tumoral ( $r= 0,65$ ,  $p= 0,008$ ) y una mayor expresión de c-myc en los adenomas extraselares comparados con los intraselares: 0,53 FC (0,39-0,89) vs 0,13 FC (0,10-0,40), respectivamente (UMW:  $p=0,034$ ) (Figura VI.2-6).

**Figura VI.2-6. Diferente expresión de ARNm de E2F1 (a) y c-myc (b) mostrada como fold change en función de la extensión tumoral en los adenomas somatotropos.**



En los subtipos CTF y CTS no se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de E2F1 o c-myc y la extensión tumoral.

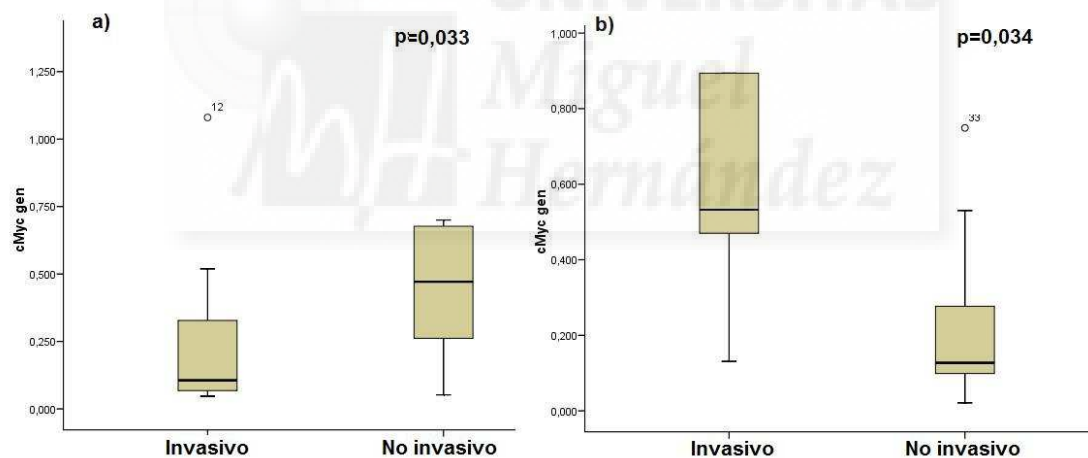
### VI.2.8.2. Invasión de estructuras adyacentes

Al estudiar la muestra globalmente, la expresión de E2F1 se asoció con la invasividad tumoral: invasivo: 2,53 (1,85-3,94) FC frente a no invasivo 1,26 (0,77-3,05) FC; UMW  $p=0,004$ . Sin embargo, al valorar cada subtipo de forma aislada encontramos diferencias estadísticamente significativas sólo en el subtipo ST.

Los tumores GT invasivos expresaron menos c-myc que los no invasivos: 1,11 FC (0,07-0,33) vs 0,47 FC (0,26-0,69), respectivamente (UMW  $p=0,033$ ) (Figura VI.2-7a).

En los tumores ST la expresión de estos genes, tanto de c-myc como de E2F1, fue diferente en función de la invasividad: a) c-myc: invasivos 0,53 (0,47-0,89) FC no invasivo: 0,13 (0,10-0,28) FC; UMW  $p=0,034$  (Figura VI.2-7b); b) E2F1 invasivo: 1,41 (1,13-2,14) FC vs no invasivo: 0,70 (0,60-0,91) FC; UMW  $p=0,018$ .

**Figura VI.2-7. Diferente expresión de ARNm de c-myc (fold change) en función de la invasividad tumoral en los adenomas: a) gonadotropos; b) somatotropos.**



### VI.2.8.3. Agresividad tumoral

Al valorar la muestra en conjunto, los valores de FC de E2F1 fueron diferentes según el grado de agresividad: alto o medio 2,52 (1,57-3,82); bajo: 1,16 (0,70-2,42); UMW  $p=0,002$ . Sin embargo, al estudiar los diferentes subtipos sólo los adenomas GT y ST mostraron diferencias en cuanto a la expresión de E2F1 en función del grado de agresividad.

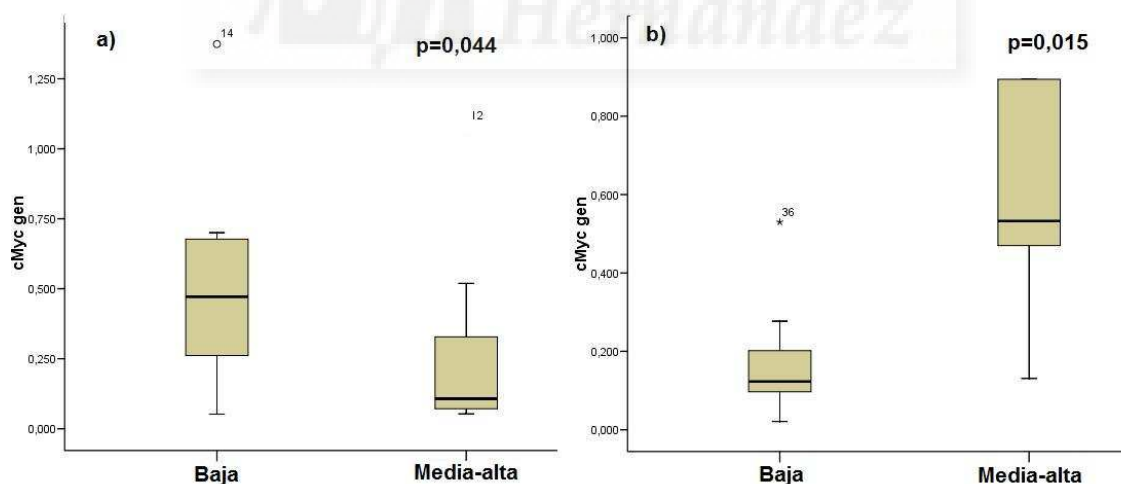
La mayoría de adenomas GT clasificados como agresividad media-alta [21/22 (95,5%)] sobreexpresaron E2F1, mientras que sólo 4/7 (57,1%) de los GT con

agresividad baja lo hicieron ( $F p=0,034$ ). Esto comportó que la sobreexpresión de E2F1 en este subtipo tumoral supusiera un riesgo de 15,8 (IC95%: 1,3-192,5) veces para agresividad media-alta.

En el subtipo ST, la expresión de E2F1 (FC) fue diferente según el grado de agresividad: alto 1,38 FC (1,17-1,96); medio 1,44 FC (1,13-2,14); bajo 0,68 FC (0,57-0,75) (K-W  $p=0,005$ ).

En cuanto a c-myc, al estudiar la muestra globalmente no se encontró diferente expresión en función del grado de agresividad. Sin embargo al clasificar por subtipos, los adenomas GT con agresividad baja presentaron mayor expresión de este gen que aquellos tumores con agresividad media-alta [0,472 (0,260-0,689) vs. 0,107 (0,069-0,330), UMW  $p= 0,0044$ ]. Los ST con agresividad baja presentaron menor expresión de c-myc que aquellos adenomas ST con agresividad media-alta [0,123 (0,095-0,277) vs. 0,533 (0,385-0,894), UMW  $p= 0,015$ ] (Figura VI.2-8).

**Figura VI.2-8. Diferente expresión de ARNm de c-myc (fold change) según de la agresividad tumoral media-alta frente a baja en los adenomas: a) gonadotropos; b) somatotropos.**



#### VI.2.8.4. Modificación en la expresión de E2F1 y c-myc por el tratamiento médico previo a la intervención quirúrgica.

Al estudiar la muestra globalmente se encontró una menor expresión de E2F1 en los adenomas que habían recibido tratamiento con SSA frente a los que no lo habían recibido: 0,91 (0,68-2,14) vs 2,25 (1,23-3,85); UMW  $p=0,013$ . Sin embargo al estudiar

la influencia del tratamiento dividiendo por subtipos moleculares, no evidenciamos dicha asociación.

En cuanto al tratamiento previo con AD no se encontraron diferencias en la expresión de estos genes, tanto al valorar la muestra global como al subclasificarla en subtipos moleculares.

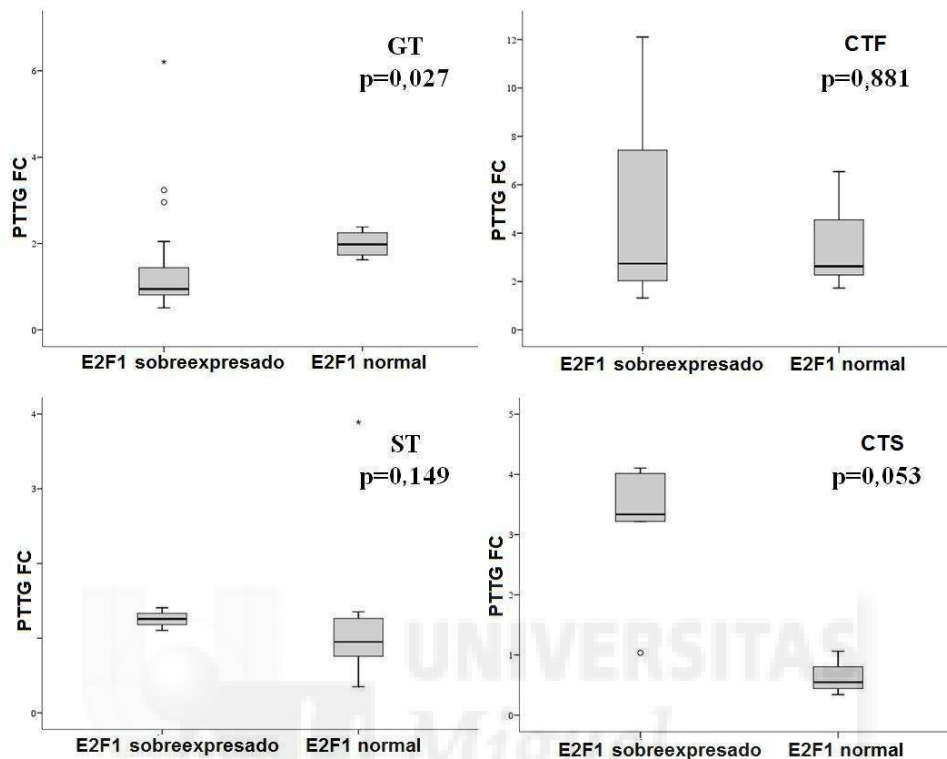
#### **VI.2.9. Relación de la expresión de PTTG con aquella de E2F1 y c-myc**

Al estudiar la muestra de forma global, no se encontró asociación entre la expresión de PTTG y E2F1.

Sin embargo, al valorar cada subtipo de forma aislada, en los adenomas GT la sobreexpresión de E2F1 comportaba una menor expresión de PTTG [0,95 (0,81-1,44) vs 1,98 (1,74-2,25); UMW  $p=0,027$ ], mientras que en los adenomas CTS se asociaba a una mayor expresión de PTTG [3,36 (3,22-4,01) vs 0,55 (0,44-0,80); UMW  $p=0,053$ ]. En los adenomas ST y CTF no se evidenció relación entre estos dos genes (Figura VI.2.9).

En cuanto a c-myc, no se encontró asociación con la expresión de PTTG tanto de forma global como al analizar por subtipos de AH.

**Figura VI.2-9. Diferente expresión de ARNm de PTTG (fold change, FC) en función de la sobreexpresión de E2F1 en los adenomas: a) gonadotropos (GT); b) corticotropos (CTF); c) somatotropos (ST); d) corticotropos silentes (CTS).**



#### VI.2.10. Expresión de microRNAs en función del subtipo de adenoma

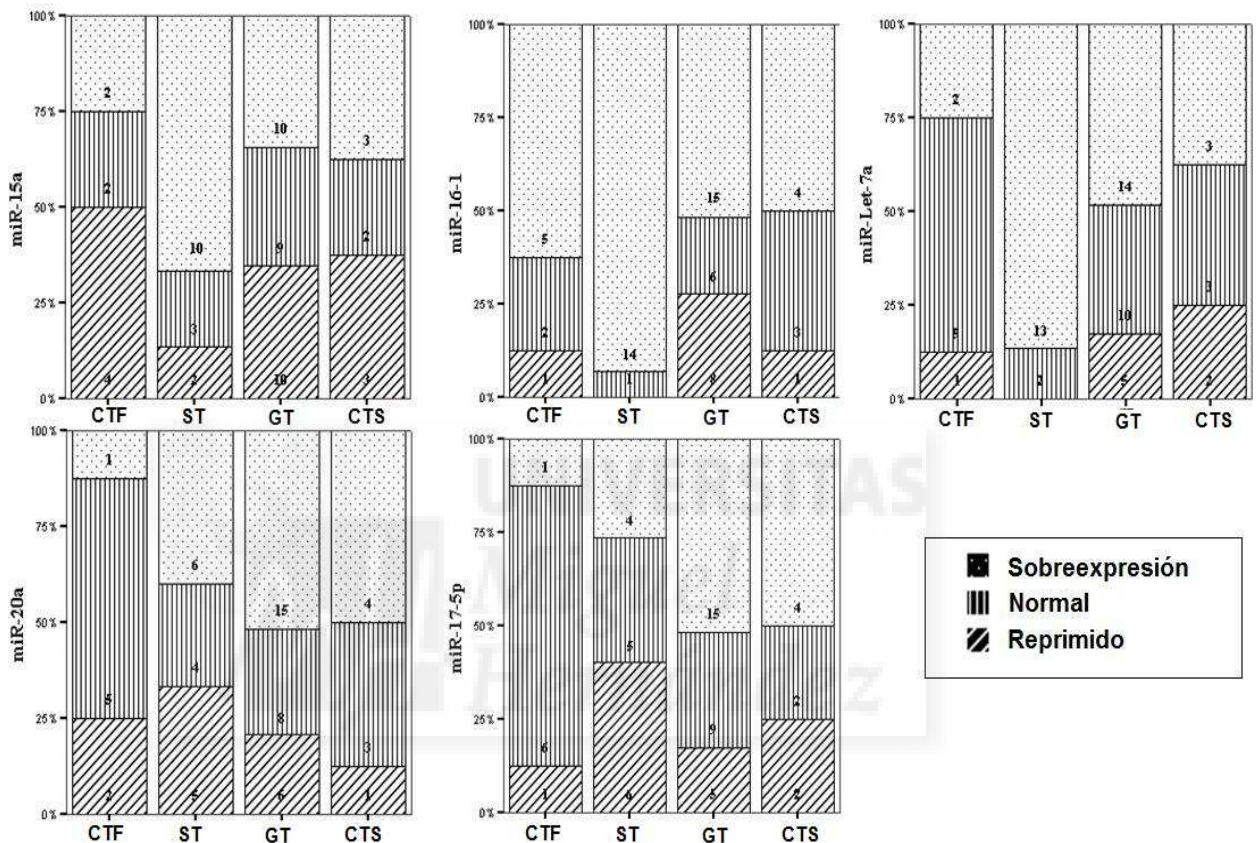
La expresión de miRNAs varió según el subtipo de AH, alcanzando la significación estadística en miR-16-1 y Let-7a (K-W;  $p=0,017$  y  $p=0,034$  respectivamente) (Tabla VI.2-6).

**Tabla VI.2-6. Expresión de los microRNAs maduros en los diferentes subtipos de adenomas hipofisarios. Significación estadística como Test de Kruskal-Wallis para las diferencias entre los subtipos.**

	miR-16-1	miR-15a	miR-20a	miR-17-5p	Let-7a
<b>Global</b>	2,04(0,80-6,52)	0,89(0,44-4,17)	1,21(0,51-2,54)	1,15(0,53-2,61)	1,61(0,80-3,74)
<b>GT</b>	1,58(0,44-3,41)	0,77(0,21-2,97)	1,69(0,72-3,16)	1,62(0,76-3,08)	1,50(0,55-3,10)
<b>CTF</b>	1,63(0,65-4,03)	0,64(0,33-1,50)	1,02(0,51-1,33)	0,69(0,53-1,34)	1,22(0,77-1,78)
<b>CTS</b>	1,64(0,78-10,06)	0,79(0,45-7,30)	1,56(0,55-9,79)	1,59(0,47-7,93)	1,39(0,50-2,29)
<b>ST</b>	6,33(2,82-13,15)	2,20(0,70-6,42)	0,83(0,46-2,21)	0,92(0,41-1,73)	2,95(1,73-7,13)
<b>p (K-W)</b>	<b>0,017</b>	0,242	0,477	0,286	<b>0,034</b>

Además se encontraron diferencias en el patrón de expresión de estos miRNAs en función del subtipo de AH aunque sin significación estadística ( $\chi^2$ ;  $p > 0.05$ ) (Figura VI.2-10).

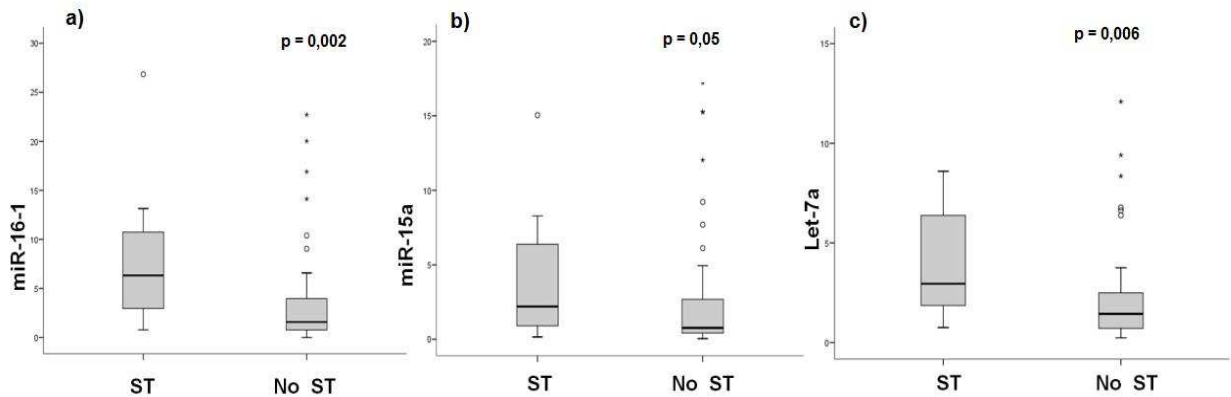
**Figura VI.2-10. Comparación entre los patrones de expresión de los diferentes miRNAs estudiados en función del subtipo de adenoma hipofisario.**



Abreviaturas: CTF, corticotropo funcionante; ST, somatotropo; GT, gonadotropo; CTS, corticotropo silente. Los números dentro de las barras corresponden al número de pacientes dentro de cada subtipo.

En cuanto a la comparación entre subtipos, los adenomas ST presentaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-15a [ST: 2,20 (0,90-6,38) vs no ST: 0,77 (0,42-2,69) FC; UMW  $p=0,05$ ]; miR-16-1 [ST: 6,33 (2,97-10,74) vs no ST: 1,58 (0,77-3,97) FC; UMW  $p=0,02$ ] y Let-7a [ST: 2,95 (1,86-6,38) vs no ST: 1,44 (0,71-2,49) FC, UMW  $p=0,01$ ] comparado con el resto de tipos (Figura VI.2-11).

**Figura VI.2-11. Diferente expresión de miRNA (fold change) comparando los adenomas somatotropos (ST) frente al resto (No ST). a) miR-16-1; b) miR-15a; c) miR-Let-7a.**



### VI.2.11. Asociación en la expresión de los microRNAs con las características clínicas del tumor

#### VI.2.11.1. Extensión tumoral

Hallamos una tendencia a mayor expresión de miR-17-5p en los tumores extraselares frente a intraselares: 1,34 FC (0,74-3,08) vs 0,61 FC (0,43-1,51), respectivamente (UMW:  $p=0.068$ ). Sin embargo, al subclasificar los AH, no se encontró asociación entre el tamaño tumoral o la extensión y la expresión de los miRNAs estudiados.

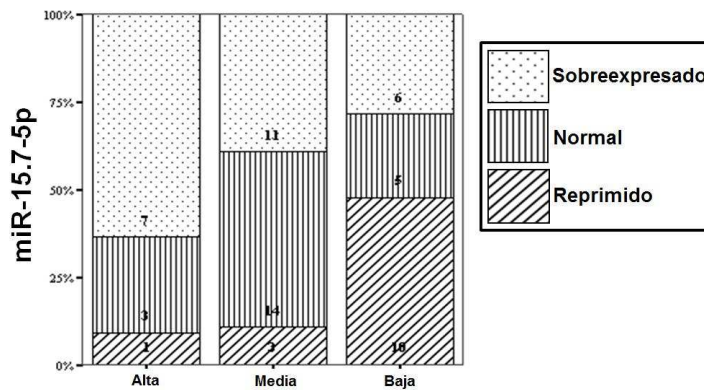
#### VI.2.11.2. Invasión de estructuras adyacentes

No se evidenciaron diferencias en cuanto a la invasión tumoral y la expresión de los diferentes miRNAs estudiados al valorar tanto la muestra globalmente como dividida por subtipos.

#### VI.2.11.3. Agresividad tumoral

Sólo se objetivaron diferencias en cuanto al grado de agresividad en el patrón de expresión de miR-17-5p valorando la muestra en conjunto ( $\chi^2 p= 0.011$ ) (Figura VI.2-12).

**Figura VI.2-12. Diferente patrón de expresión de miR-17-5p (fold change) en la muestra global según el grado de agresividad tumoral.**



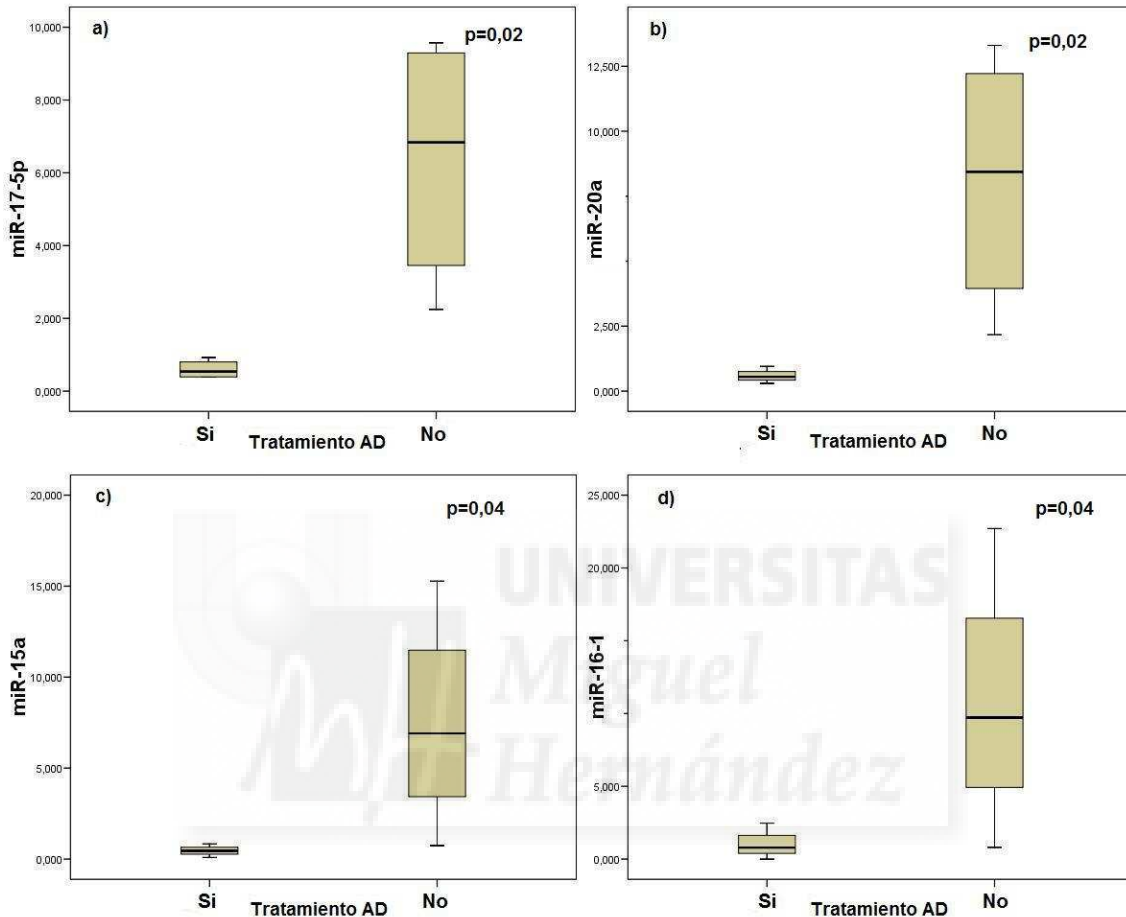
#### **VI.2.11.4. Modificación en la expresión de miRNAs por el tratamiento médico previo a la intervención**

En la muestra en conjunto, la expresión de miR-16-1 y Let-7a fue mayor en los tumores que habían recibido de forma previa a la cirugía tratamiento con SSa [tratados: 7,78 (1,75-6,34) vs no tratados: 1,77 (0,78-4,56) FC; UMW p=0,005; y tratados: 5,36 (2,01-7,23) vs no tratados: 1,49 (0,76-2,89) FC; UMW p=0,010; respectivamente]. Sin embargo, al valorar de forma aislada los adenomas ST dicha asociación se pierde.

En cuanto al tratamiento con AD, al valorar toda la muestra no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los diferentes miRNAs estudiados. Sin embargo, al estudiar el subtipo CTS se objetivó una menor expresión en los pacientes tratados con AD (4 pacientes tratados de 8) de miR-17-5p [tratados: 0,54 (0,39 - 0,86) vs no tratados: 6,84 (2,85-9,43) FC; UMW p=0,02], miR-20a [tratados: 0,55 (0,36 - 0,86) vs no tratados: 8,44 (3,06-12,76) FC; UMW p=0,02], miR-15a [tratados: 0,46 (0,18 - 0,74) vs no tratados: 6,91 (2,09-13,78) FC; UMW p=0,04] y miR-16-1 [tratados: 0,79 (0,20 - 2,05) vs no tratados: 9,72 (2,86-19,63) FC; UMW p=0,04] (Figura VI.2-13).

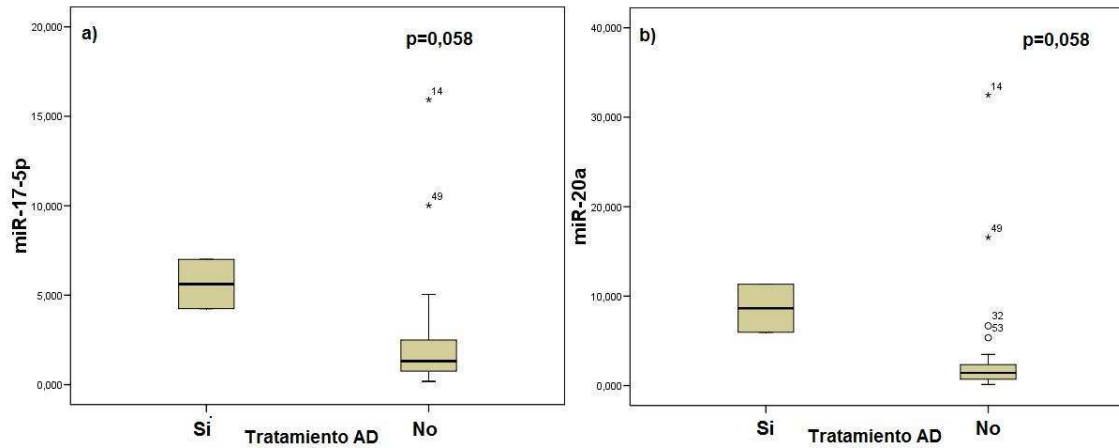


**Figura VI.2-13. Diferencias en la expresión de los diferentes miRNAs (fold change) en los adenomas corticotropos silentes en función del tratamiento previo con agonistas dopaminérgicos (AD): a) miR-17-5p, b) miR-20a, c) miR-15a, d) miR-16-1.**



Además los adenomas GT presentaban una tendencia a la significación estadística en cuanto a una mayor expresión en los pacientes tratados con AD (2 de 27) de los miRNAs miR-17-5p [tratados: 5,62 (4,25 – 6,99) vs no tratados: 1,32 (0,76-2,50) FC, UMW  $p=0,058$ ] y miR-20a [tratados: 8,65 (5,97 – 11,33) vs no tratados: 1,43 (0,72-2,35) FC, UMW  $p=0,058$ ] (Figura VI.2-14).

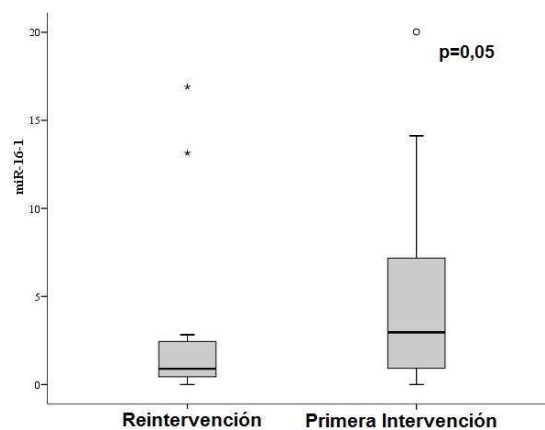
**Figura VI.2-14. Diferencias en la expresión de los diferentes miRNAs (fold change) en los adenomas gonadotropos en función del tratamiento previo con agonistas dopaminérgicos (AD): a) miR-17-5p, b) miR-20a.**



#### VI.2.11.5. Asociación entre los miRNAs y la necesidad de reintervención quirúrgica

La expresión de miR-16-1 fue menor en aquellas muestras tumorales provenientes de reintervenciones, bien por persistencia de restos tumorales o bien por recurrencia, que en las muestras tumorales procedentes de una primera intervención: 0,90 (0,44-2,45) vs 2,96 (0,92-7,48) ( $p=0,051$ ) (Figura VI.2-15).

**Figura VI.2-15. Comparación de la expresión de miR-16-1 (fold change) en la muestra global en función de si se trataba o no de una reintervención.**



### VI.2.12. *Regulación de la expresión de PTTG por los diferentes miRNAs estudiados*

En la muestra global la expresión de PTTG no se correlacionó de forma significativa con ningún miRNA estudiado. Sin embargo, al estudiar los diferentes subtipos de AH sí que se encontraron algunas asociaciones estadísticamente significativas. De acuerdo al estudio multivariante, éstas se comportaron como variables dependientes (MLR  $p > 0,05$ ).

En los adenomas GT, la expresión de PTTG (FC) se correlacionó de forma negativa con la expresión de Pri-miR-17~92 ( $r = -0,413$ ;  $p = 0,026$ ) y mostró una tendencia a la correlación positiva con miR-15p ( $r = 0,350$ ;  $p = 0,063$ ).

En los adenomas ST, la expresión de PTTG (FC) se correlacionó de forma negativa con miR-20a ( $r = -0,518$ ;  $p = 0,048$ ) y con let-7a ( $r = -0,514$ ;  $p = 0,050$ ).

En los adenomas CTF, la expresión de PTTG (FC) se correlacionó de forma negativa con miR-17-5p ( $r = -0,595$ ;  $p = 0,120$ ) y miR-20a ( $r = -0,619$ ;  $p = 0,102$ ), mientras que la correlación fue positiva con su miRNA inmaduro pri-miR-17~92 ( $r = 0,548$ ;  $p = 0,160$ ).

En los adenomas CTS, la expresión de PTTG (FC) se correlacionó de forma positiva con miR-17-5p ( $r = 0,738$ ;  $p = 0,037$ ) y miR-20a ( $r = 0,643$ ;  $p = 0,086$ ).

### VI.2.13. *Regulación de la expresión de E2F1 y c-myc por los diferentes miRNAs estudiados*

En la muestra en conjunto los tumores con represión de c-myc tenían menor expresión de pri-miR-17~92 comparado con los tumores que no reprimían c-myc [0,10 FC (0,07-0,22) vs. 0,23 FC (0,11-0,36) (K-W  $p = 0,014$ )]. Por otra parte, E2F1 se correlacionó de forma negativa con miR-16-1 ( $r = -0,260$ ;  $p = 0,045$ ) y Let-7a ( $r = -0,276$ ;  $p = 0,033$ ).

Al estudiar los diferentes subtipos de AH por separado, en los tumores ST se evidenció una correlación entre la expresión de c-myc y miR-17-5p ( $r = 0,456$ ;  $p = 0,088$ ).

En los adenomas CTS, E2F1 se correlacionó de forma negativa con pri-miR-17~92 ( $r=-0,714$ ;  $p=0,047$ ); mientras que en los adenomas CTF dicha correlación fue positiva ( $r=0,690$ ;  $p=0,058$ ). Además este subtipo presentaba una correlación negativa entre E2F1 y Let-7a ( $r=-0,667$ ;  $p=0,071$ ) y una fuerte correlación entre c-myc y miR-16-1 ( $r=0,762$ ;  $p=0,028$ ).





## **VII. DISCUSIÓN**

## **VII.1. Distribución de las muestras estudiadas en función de la clasificación de los adenomas hipofisarios**

La clasificación más empleada de los adenomas hipofisarios se basa en las características anatomopatológicas de la lesión, principalmente en la tinción IHQ (3, 4).

En la primera fase de nuestro estudio no se realizó una selección de los diferentes subtipos de adenomas, por lo que la representación de éstos vino condicionada por la prevalencia de los mismos y la disponibilidad de material biológico para la realización de los estudios moleculares. Los adenomas funcionantes suelen tener un menor tamaño que aquellos no funcionantes, hecho que pudo haber limitado la representación de los mismos en la muestra global.

La segunda fase del estudio se realizó sobre muestras seleccionadas del Biobanco del HGUA procedentes del proyecto REMAH. Estas muestras provenían de cuatro centros hospitalarios (HGUA, Hospital de La Ribera, Hospital Universitario y Politécnico La Fe y Complejo Hospitalario Universitario de Albacete). Dado que no se pudo centralizar el estudio inmunohistoquímico en un centro y el informe anatomopatológico era diferente según la procedencia de la muestra (cuantitativo como porcentaje de células teñidas; semicuantitativo o incluso cualitativo, como tinción positiva o no), decidimos valorar la posibilidad de realizar una clasificación basada en la expresión de ARNm de las diferentes hormonas hipofisarias y receptores hormonales sobre toda la colección de tumores hipofisarios del Biobanco del HGUA. Esta clasificación fue especialmente útil tanto en aquellos casos de AH no funcionante con tinción positiva a varias hormonas como en los que la tinción fue negativa para todas ellas. Asimismo nos permitió definir el subtipo CTS, dado que algunos casos se podrían haber considerado como nulos al no presentar tinción IHQ probablemente por un fallo en el procesamiento de la hormona ACTH. En el momento actual la caracterización de este subtipo de AH supone una línea nueva de investigación de nuestro grupo.

Aunque la mayoría de autores abogan por mantener la IHQ como piedra angular de la clasificación de los AH, si bien añadiendo factores que permitan graduar la agresividad tumoral (76); otros autores postulan que se deben tener en cuenta otras técnicas disponibles actualmente, como la qPCR o el WB, para una clasificación más precisa de este tipo de tumores (77, 78).

## VII.2. Expresión de PTTG en los adenomas hipofisarios.

En la primera fase no pudimos establecer patrones de expresión génica de PTTG al no disponer de hipófisis normales. Sin embargo, cabe destacar que encontramos 11 tumores sin expresión de este gen (6 GT, 3 ST, 1 TT, 1 LT). Por el contrario, en la segunda fase del estudio sólo hallamos represión en la expresión de PTTG en 3 casos (2 ST, 1 CT), expresando este gen el resto de tumores en rango igual o superior a las muestras de hipófisis normales. Aunque existen diferencias metodológicas, la mayor parte de autores describen una expresión de PTTG mayor en los AH que en la hipófisis normal, aunque hay tumores en los que se reporta represión del gen (59, 62, 63, 65).

### VII.2.1. *Diferencias entre subtipos de adenoma hipofisario*

En cuanto a la existencia de diferencias en la expresión de PTTG según el subtipo de AH, encontramos datos discordantes entre las dos fases del estudio. En la primera fase no se objetivaron diferencias entre los distintos subtipos, mientras que el estudio en muestras congeladas mostró tanto una expresión (FC) como un patrón de expresión de PTTG distinto según el subtipo de AH de que se tratase. Estas discrepancias pueden ser debidas a la diferente preservación del tejido tumoral y a la distribución por subtipos de AH de las dos muestras. En la segunda fase los adenomas de estirpe corticotropa (CTF y CTS), que demostraron una mayor sobreexpresión de PTTG frente al resto de subtipos, supusieron un 26% del total mientras que en la primera fase los CTF representaban sólo un 6,5% .

Los datos disponibles en la literatura tampoco son homogéneos, tal y como se ha mostrado en la tabla II.6-1. Nuestros datos concuerdan con los de Jia y colaboradores en cuanto a una mayor expresión de PTTG en los adenomas CT (70). Sin embargo el resto de autores no encuentran esta asociación: en dos estudios existe una mayor expresión en los adenomas ST frente al resto (61, 69); los grupos de Filippella (63) y Tena-Suck (66) describen una sobreexpresión en los adenomas NF, etc. Estas discrepancias pueden estar justificadas por la diferente metodología empleada (IHQ, qPCR, WB) y la distribución por subtipos de los estudios, teniendo en cuenta que en muchas ocasiones sólo se clasifican según la funcionalidad.

### VII.2.2. *Diferencias según el comportamiento tumoral (invasividad, agresividad y / o recurrencia)*

La expresión de PTTG fue menor en los tumores invasivos en ambas fases del estudio al valorar la muestra globalmente. Al diferenciar por subtipos, en la primera fase únicamente los adenomas funcionantes en conjunto presentaron diferencias en la expresión de PTTG en relación con la extensión e invasividad tumoral. Todos los adenomas GT eran invasivos, por lo que no se encontraron diferencias en los tumores no funcionantes. Por el contrario, en la segunda fase del estudio sólo se evidenció una menor expresión de PTTG en los tumores GT invasivos (20/28). Esto refuerza la idea de la importancia que tiene la muestra seleccionada a la hora de valorar los resultados obtenidos.

Nuestros datos contrastan con lo publicado hasta el momento ya que, aunque muchos autores no encuentran diferencias en la expresión de PTTG según la extensión tumoral o la invasión de estructuras adyacentes (61-64, 68, 69); otros investigadores evidencian mayor expresión de PTTG en los adenomas invasivos (59, 70-72). Sin embargo estos estudios son heterogéneos en cuanto a composición de la muestra, metodología y criterios de valoración de la extensión o invasión tumoral. En el estudio de Zhang (59), únicamente encuentran asociación entre la sobreexpresión de PTTG y la invasión del seno esfenoidal en los adenomas funcionantes (10 LT, 13 ST, 1 CT). Jia y colaboradores (70) comparan la expresión de ARNm de PTTG entre macroadenomas con invasión del seno cavernoso, esfenoidal, tercer ventrículo o ventrículos laterales (29 tumores: 10 NF, 4 LT, 4 ST, 7 GT, 2 CT, 1 TT y 1 mixto) y macroadenomas no invasivos (41 tumores: 22 NF, 2 LT, 6 ST, 7 GT, 1 CT y 3 mixtos), evidenciando una mayor expresión en los adenomas invasivos. Estas discordancias pueden ser debidas, al menos en parte, a la distribución por subtipos de la muestra ya que en nuestra opinión cada subtipo de AH tiene unas características únicas y las comparaciones en cuanto a las variables resultado deberían realizarse sólo dentro del mismo subtipo. Los metaanálisis publicados en 2014 (71, 72) no consideraron de suficiente calidad metodológica los trabajos anteriores y, valorando únicamente estudios en población asiática, encontraron que los tumores invasivos presentaban mayor tinción IHQ de PTTG, concluyendo que la expresión de este gen podría conferir un peor pronóstico. Por todo esto, consideramos que habría que analizar de forma homogénea la expresión de PTTG, tanto metodológicamente como unificando el criterio de invasión, según cada subtipo de AH.



Al valorar conjuntamente la invasión tumoral y la proliferación celular (medida ésta por el índice Ki67), hallamos en la segunda fase del estudio una mayor expresión de PTTG en los tumores con un grado alto de agresividad al estudiar la muestra globalmente, mientras que al dividir por subtipos sólo existían diferencias estadísticamente significativas en el caso de los adenomas GT y eran opuestas a los resultados previamente referidos (mayor expresión de PTTG en los tumores GT con agresividad baja). Estas diferencias pueden ser debidas a que el único tumor CTS con agresividad alta sobreexpresaba en gran medida PTTG, aunque por escaso tamaño muestral no se evidencian diferencias estadísticamente significativas al analizar este subtipo de forma aislada. Otra explicación posible es que en la muestra global la expresión de PTTG se asociase de forma positiva con la proliferación celular, tal y como describen algunos autores (63, 64). Por el contrario, en la primera fase del estudio no se encontró asociación entre el grado de agresividad y la expresión de PTTG, probablemente debido a que en este fase del estudio no existió correlación entre Ki67% (medido mediante IHC) y la expresión de PTTG.

Por otra parte, no encontramos diferencias en cuanto a la expresión de ARNm de PTTG y la recurrencia tumoral, entendiendo ésta como un aumento mayor del 20% en cualquiera de los diámetros del resto tumoral durante el seguimiento. Nuestros resultados concuerdan con los publicados por otros autores (62, 64, 70). Sin embargo, existen algunas publicaciones en las que sí se demuestra una asociación entre la expresión de PTTG y la recurrencia tumoral. Filippella y colaboradores (63) estudian a 27 pacientes con seguimiento mayor de un año de los que 16 tumores (7 GT, 3 NF, 2 LT, 2 ST, 2 CT) presentaron recurrencia, definida como reaparición de hipersecreción hormonal en el caso de los tumores funcionantes o crecimiento / reaparición de restos tumorales en los tumores NF. Mediante curva COR objetivan que los adenomas con mayor expresión de PTTG (IHQ) y niveles altos de Ki67 presentaban un menor tiempo de recidiva, fijando un punto de corte para ambos de 2,9%. Por su parte, Noh (67) estudia 35 adenomas NF de los que 26 tumores presentan recurrencia (crecimiento de restos tumorales sin cuantificar): 16 temprana (antes de los 4 años) y 10 tardía (posterior a los 4 años de la intervención). En su trabajo la expresión de PTTG (IHQ) es mayor en los tumores con recurrencia temprana frente a los que no recurren, sin encontrar diferencias en el caso de la recurrencia tardía. Otro estudio demuestra asociación mediante curvas de supervivencia entre la expresión de PTTG (qPCR) y la recurrencia

(7/60) o la progresión tumoral (12/34) en adenomas LT (68). Una vez más, la disparidad en la definición de la variable resultado (recurrencia), la composición de la muestra y la metodología empleada pueden justificar las diferencias con nuestros resultados.

### VII.2.3. *Efecto del tratamiento médico previo*

En ninguna de las dos fases del estudio se evidenciaron diferencias en la expresión de PTTG entre los AH que habían recibido tratamiento médico previo a la cirugía y los tumores sin tratamiento. Nuestros resultados concuerdan con dos trabajos realizados con adenomas LT (74, 75). Sin embargo, Salehi describe una menor tinción IHQ de PTTG en los adenomas ST que habían recibido tratamiento con SSA (9/17 tumores) (69). Las diferencias metodológicas (nosotros cuantificamos expresión de ARNm y Salehi valora tinción IHQ) pueden justificar esta diferencia, aunque habría que diseñar estudios cuyo objetivo principal sea valorar esta posible asociación.



### VII.3. Expresión de E2F1 en los adenomas hipofisarios

E2F es una familia de factores de transcripción que controlan la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular, apoptosis, reparación del ADN y diferenciación celular. La desregulación de su actividad transcripcional se ha asociado al desarrollo de numerosos tumores humanos al dar lugar a alteraciones en la vía p16 (INK4a)-ciclina D1- retinoblastoma (Rb). Sin embargo, E2F1 puede actuar tanto como oncogen como gen supresor de tumores de forma específica en cada tejido, en función de las diferentes vías de regulación que son dependientes del contexto celular (37, 38).

En la muestra estudiada la expresión de ARNm de E2F1 fue diferente según el subtipo de AH, con un predominio de la expresión normal o aumentada en todos los subtipos (Figura VI.2-5). En la literatura únicamente existe un trabajo con muestras humanas en las que se evidencia una sobreexpresión de E2F1 en los prolactinomas (79). Estudios con animales han demostrado la capacidad de tumorigénesis también en adenomas ST (80).

En cuanto a las características tumorales, al estudiar la muestra en conjunto la expresión de E2F1 se correlacionó de forma positiva con el tamaño tumoral y su mayor expresión se asoció con la extensión extraselar, la invasión de estructuras adyacentes y el grado de agresividad tumoral. Al diferenciar por subtipos de adenoma, únicamente los tumores ST extraselares o invasivos mostraron mayor expresión de este factor de transcripción frente a los tumores intraselares o no invasivos. Además los tumores con agresividad media alta de los subtipos ST y GT presentaban una mayor expresión de E2F1 que los tumores con agresividad baja. Curiosamente, sin embargo, la expresión de E2F1 se correlacionó de forma negativa con el tamaño tumoral en los adenomas GT, lo que hace pensar que en este subtipo la asociación con el grado de agresividad viene determinada principalmente por cambios en la proliferación celular.

Hasta el momento no se ha valorado el papel de E2F1 como factor pronóstico en los AH. Su estudio en otros tipos de tumores y en cultivos celulares ha demostrado que se trata de una proteína con doble funcionalidad, como oncogen y como gen supresor de tumores(37, 38). Parte de la capacidad oncogénica de E2F1 parece estar mediada por la familia de proteínas High Mobility Group (HMGA1 y 2), las cuales juegan un papel

importante en la formación de tumores hipofisarios (80-83). Estas proteínas actúan de forma diferente según el subtipo de AH, siendo uno de los mecanismos la regulación al alza del factor de transcripción Pit-1 que favorece la proliferación de células ST, LT y TT (84). Por otra parte, E2F1 también puede actuar como gen supresor de tumores en determinados tejidos, habiendo sido descrita esta doble función en tumores hipofisarios en estudios con modelos animales (79, 85-88).

Tomando todos estos datos en conjunto, E2F1 podría actuar como oncogen en los AH, especialmente en el caso de los adenomas ST.



#### **VII.4. Expresión de c-myc en los adenomas hipofisarios**

El proto-oncogen c-myc está implicado en la patogénesis de muchos tumores humanos, aunque su papel en los AH no está completamente aclarado. Este proto-oncogen es capaz de regular tanto el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular como la apoptosis. Una de las funciones más importantes de c-myc es el control de la entrada en la fase S del ciclo celular mediante la regulación de la expresión de E2F1 tanto a nivel de su transcripción como a nivel post-transcripcional a través de ciertos miRNAs (89). La activación del oncogen c-myc está controlada por múltiples mecanismos celulares que tratan de evitar la tumorigénesis, como el arresto proliferativo, la senescencia y la apoptosis. Cuando estos mecanismos fallan, la desregulación de c-myc se ha implicado en la iniciación y progresión tumoral mediante la activación de la replicación y la transcripción, el aumento de la proliferación celular y el bloqueo tanto de la diferenciación celular como de la senescencia (90).

En nuestra muestra la expresión de ARNm de c-myc fue distinta según el subtipo de AH estudiado, predominando la expresión normal o reprimida del gen. Únicamente los adenomas CTS presentaron sobreexpresión de c-myc (Figura VI.2-4). En cuanto a las características tumorales, al estudiar por subtipos encontramos un papel opuesto en tumores ST y GT. En el caso de los adenomas ST, c-myc se correlacionó de forma positiva con el tamaño tumoral y se asoció una mayor expresión de este oncogen con los tumores extraselares, invasivos y con agresividad media-alta. Sin embargo, en el subtipo GT la mayor expresión de c-myc se cuantificó en los tumores no invasivos y con agresividad baja. Estas diferencias pueden ser debidas a una diferente regulación de c-myc en función del contexto tumoral.

En la literatura se ha descrito la expresión de c-myc aumentada en algunos tumores hipofisarios, sin correlación con la tasa de proliferación celular (91, 92). Estos datos provienen de investigaciones llevadas a cabo en la década de los 90, valorando bien ADNc para detectar amplificaciones génicas y reordenamientos (91), o bien ARNm mediante “RNA protections assays” (92), técnica menos fiable que la qPCR. Un estudio más reciente valora la expresión de c-myc en AH y no encuentra diferencias en la expresión de c-myc total al comparar con hipófisis normales, sin mostrar tampoco diferencias entre subtipos de AH (16 NF, 6 ST, 6 LT, 6 CT). Sin embargo refiere una

menor fosforilación Thr58/Ser62 de c-myc en los AH comparado con hipófisis normales, sin diferencias entre los subtipos (93). La discrepancia con nuestros resultados probablemente sea debida a la diferente composición de la muestra estudiada. Por otra parte, no existen datos en la literatura que nos permitan contrastar nuestros hallazgos sobre la diferente expresión de c-myc en función del comportamiento de los AH. Por todo esto, consideramos que sería necesario diseñar nuevos estudios para aclarar el papel de c-myc en cada subtipo AH.



## VII.5. Expresión de los miRNAs estudiados en los adenomas hipofisarios

La alteración en el patrón de expresión de los miRNAs tiene un papel central en la oncogénesis y la progresión tumoral (94-96).

### VII.5.1. *Cluster Pri-miR-17~92*

Pri-miR-17~92 es un miRNA primario que al ser procesado da lugar a los miRNAs maduros 17, 18a, 19a, 20a, 19b1 and 92a1. Este complejo policistrónico proviene de la regulación de c-myc sobre su propio promotor en el locus c13orf25 del cromosoma 13q31.3 (97), aunque también está regulado por factores de la familia E2F (98). Entre sus funciones se encuentra la regulación de genes supresores de tumores como PTEN y p21, así como JNK2 (99), que a su vez regula la expresión del factor de transcripción E2F1 (39).

En la muestra Pri-miR-17~92 mostró niveles bajos de expresión en el 93,3% (56/60) de los tumores, sin sobreexpresarse en ningún caso. El nivel de expresión de pri-miR-17~92 fue menor conforme aumentaba la expresión de los miRNAs maduros estudiados (miR-17-5p y miR-20a), lo que sugiere que existía un alto procesamiento en lugar de una baja transcripción del mismo. Por otra parte, los patrones de expresión de miR-17-5p y miR-20a fueron diferentes según el subtipo de AH (Figura VI.2- 10). En los adenomas GT y CTS predominaba la sobreexpresión de estos miRNAs. Al estudiar la muestra globalmente, miR-17-5p presentaba mayor sobreexpresión conforme aumentaba el grado de agresividad (Figura VI.2- 12). Esto podría convertir a este miRNA en un marcador pronóstico en los AH. Sin embargo, al no existir publicaciones sobre el papel de estos miRNAs en estos tumores no podemos contrastar nuestros resultados. Del mismo modo tampoco podemos valorar la significación de la menor expresión de miR-17-5p y miR-20a en los adenomas CTS que habían recibido previamente tratamiento con AD.

### VII.5.2. *Let-7*

Let-7 es una familia de miRNAs descrita inicialmente como supresora de tumores al regular la expresión del proto-oncogen Ras en el cáncer de pulmón (100). Se

encuentra regulada por c-myc, pero a su vez Let-7a es capaz de regular la expresión de este proto-oncogen dando lugar a un bucle regulatorio (101).

La expresión de Let-7a fue predominantemente igual (40%) o superior (42%) a la de las muestras de hipófisis normal en este estudio, siendo diferente según el subtipo de AH (Tabla VI.2-6 y Figura VI.2- 10). Los adenomas ST presentaron mayor expresión de este miRNA que el resto de tumores, preponderando en este subtipo la sobreexpresión (86%). Otros autores han estudiado el papel de este miRNA en los AH. Qian y colaboradores (102) encuentran también una sobreexpresión en los adenomas ST, aunque en los tumores CT y GT refieren que Let-7 se encuentra reprimido en un 58% y 35% de los tumores respectivamente. Estas diferencias pueden ser debidas a que estos autores valoran la expresión de varios miembros de la familia Let-7 mientras que nosotros sólo estudiamos a Let-7a. Sin embargo, Amaral y colaboradores (103) refieren también menor expresión de Let-7a en 11 adenomas CT comparados con muestras de hipófisis normales. Cabe señalar que los resultados no son del todo equiparables, ya que en su caso no utilizan el mismo método de comparación de los niveles de expresión entre las muestras tumorales y las muestras control.

En nuestra muestra Let-7a no se asoció a las variables clinicopatológicas estudiadas, pero este miRNA presentaba una correlación negativa con la expresión de E2F1, lo que sugiere que podría tener un papel como supresor de tumores. Aunque Amaral (103) no encuentra asociación entre Let-7a y el tamaño tumoral o la tasa de remisión tras la cirugía, otros estudios en AH han demostrado que la represión de Let-7 se asocia con tumores invasivos y con la sobreexpresión de oncogenes como HMGA2 (102), regulado éste por E2F1. Por tanto, aunque precisa confirmación, Let-7a parece tener un comportamiento supresor tumoral en los AH.

### VII.5.3. *Cluster miR-15a and miR-16-1*

Los genes del cluster miR-15a y miR-16-1 están localizados en el cromosoma 13q14. La delección de éste, que también afecta al gen Rb, se describió en primer lugar en la leucemia linfoblástica crónica B y posteriormente se ha comprobado en AH, asociada además a una mayor agresividad tumoral (42, 104, 105). Estos miRNAs, regulados también por c-myc, inhiben la proliferación celular y promueven la apoptosis, por lo que son considerados supresores de tumores (106, 107).



En nuestra muestra los patrones de expresión de miR-15a y miR-16-1 fueron diferentes según el subtipo de AH (Figura VI.2-10). En los adenomas GT, CTS y CTF predominaba la expresión baja de miR-15a, pero el 66,7% de los tumores ST sobreexpresaban este miRNA. Por otro lado, miR-16-1 se expresaba de forma similar o superior a la hipófisis normal en la mayoría de tumores, encontrándose sobreexpresión del mismo en el 93,3% de los adenomas ST. Este cluster ha sido estudiado previamente en AH con resultados no concordantes con los nuestros. Amaral y colaboradores describen represión de estos miRNAs en 11 adenomas CT (103). Nuestros resultados son similares en cuanto a miR-15a, pero en el caso de miR-16-1 sólo un tumor CT reprimía este miRNA. Sin embargo se debe tener en cuenta que este grupo presenta datos de nivel de expresión, sin determinar patrones de expresión por lo que la comparación tampoco es directa con nuestros resultados. Se debería estudiar en muestras más amplias y con la misma metodología la expresión de miR-16-1 en los adenomas CT. Otro trabajo publicado valora la expresión de estos miRNAs en 10 adenomas ST y evidencia una regulación a la baja de ambos (105). Sin embargo, existen diferencias metodológicas dado que emplean una PCR semi-cuantitativa. Además la composición de la muestra fue diferente en cuanto al sexo (el porcentaje de hombres en su trabajo fue de 7/10 comparado con 6/15 en nuestro estudio), lo cual puede tener importancia ya que la expresión de ambos miRNAs en los adenomas ST fue menor en los hombres según nuestros resultados [miR-15a: hombres 1,43 (0,63-2,20) vs mujeres 6,34 (2,20-6,73) FC, UMW  $p=0,059$ ) y miR-16-1: hombres 2,97 (2,06-4,52) vs mujeres 3,51 (0,63-7,67) FC, UMW  $p=0,034$ ].

En cuanto a las características clinicopatológicas del tumor, ninguno de estos miRNAs se asoció con la extensión o agresividad tumoral en este trabajo. Sin embargo, las muestras obtenidas en una reintervención expresaban menor miR-16-1 que las muestras de pacientes que se intervenían por primera vez (Figura VI.2-15). Además este miRNA se correlacionó de forma negativa con la expresión de E2F1, lo que apoyaría que miR-16-1 se comportase como supresor tumoral en los AH. La demostración de una correlación negativa de miR-16-1 con el diámetro tumoral llevada a cabo por Bottoni (105), junto con una menor expresión del mismo en macroadenomas invasivos comparados con macroadenomas no invasivos evidenciada por Renjie (108) también sugeriría un papel protector de este miRNA.

En cuanto al hallazgo de una menor expresión de miR-15a y miR-16-1 en los adenomas CTS que habían recibido previamente tratamiento con AD no existen datos con los que contrastar su causa y significado. Una posible explicación sería que los adenomas no funcionantes con un peor comportamiento fuesen los que recibiesen este tratamiento para intentar frenar su crecimiento hasta que el paciente fuese intervenido.



## VII.6. Regulación de PTTG

La regulación de PTTG es compleja y en ella se involucran numerosos factores tanto intrínsecos como extrínsecos a la célula. Existen datos en la literatura que apoyan la regulación de PTTG por E2F1, como la co-sobreexpresión y la inmunoprecipitación de E2F1 unido al promotor de PTTG (36). Este trabajo apoya dicha regulación en los AH, aunque varía y parece ser específica de cada subtipo de AH.

### VII.6.1. *Adenomas gonadotropos*

En estos AH la sobreexpresión de E2F1 se asoció con una menor expresión de PTTG (Figura VI.2-9). De hecho, en los tumores GT no invasivos E2F1 (FC) se correlacionó de forma negativa con PTTG (FC) ( $r = -0,738$ ,  $p = 0,037$ ). Estos datos concuerdan con el hallazgo de que en este subtipo los tumores con agresividad media-alta, expresaban menor PTTG y mayor E2F1 que los tumores con agresividad baja.

En este subtipo, la expresión de PTTG se correlacionó de forma negativa con pri-miR-17~92, lo cual podía explicar la relación entre E2F1 y este gen. Los miRNA maduros de este pri-miR controlan la transición a la fase celular G1 en la que también están implicados tanto E2F1 como PTTG. La actuación de estos miRNAs podría dar lugar a la acumulación prematura de E2F1, formando un bucle regulatorio (36, 41, 43, 97) que conllevaría a una menor expresión de PTTG.

### VII.6.2. *Adenomas corticotropos silentes*

En los adenomas CTS la sobreexpresión de E2F1 se asoció con una mayor expresión de PTTG, al contrario de lo que ocurre en los adenomas GT (Figura VI.2-9). A parte, PTTG se correlacionó de forma positiva con miR-17-5p and miR-20a, mientras que E2F1 lo hizo de forma negativa con pri-miR-17~92. En este subtipo de adenoma existía una sobreexpresión importante de los miRNAs maduros, probablemente debido a un alto procesamiento del pri-miR. Estos datos sugieren que la vía c-myc-E2F1- cluster miR-17~92 –PTTG está aumentada en los adenomas CTS. Sin embargo no existen datos publicados con los que contrastar esta hipótesis.

### VII.6.3. *Adenomas corticotropos funcionantes*

Los adenomas CTF no presentaron asociación entre la expresión de PTTG y los genes y miRNAs estudiados. Sin embargo, los mayores niveles de expresión de PTTG se daban en este subtipo y éstos se correlacionaron de forma negativa con el tamaño tumoral, por lo que el papel de este gen en los adenomas CTF podría ser protector. Son necesarios, por tanto, nuevos estudios que investiguen otras vías de regulación de PTTG en los este subtipo de AH.

### VII.6.4. *Adenomas somatotropos*

En este subtipo de AH no encontramos asociación entre la expresión de PTTG y E2F1. Sin embargo, PTTG se correlacionó de forma negativa con miR-20a y Let-7a, ambos bajo regulación de c-myc. Aunque en la muestra no se aprecie asociación entre estos miRNAs y c-myc, este gen sí que se correlacionó de forma positiva con miR-17-5p, habitualmente co-expresado con miR-20a, por lo que podría existir un bucle regulatorio negativo entre c-myc y PTTG en los adenomas ST. Dado que tanto la expresión de miR-17-5p en la muestra global como la expresión de c-myc en los adenomas ST se asociaron a un peor pronóstico, el papel de PTTG podría ser protector en este subtipo de AH.



***VIII. LIMITACIONES***

El estudio realizado puede presentar algunas limitaciones, que quedan recogidas en los siguientes apartados:

1. La clasificación molecular de los AH empleada en la segunda fase del estudio no está validada.

2. Para el estudio de la regulación génica es preciso contar con cultivos celulares en los que realizar transfección de genes o con modelos animales knock-out. Aún así la regulación de PTTG por E2F1 ya ha sido previamente probada en modelos de cultivos celulares y se ha comprobado que el factor de transcripción E2F1 actúa a nivel del promotor de PTTG, lo que refuerza la asociación entre la expresión de ambos genes.

3. La variable agresividad se ha definido basándonos en los criterios empleados por numerosos autores para valorar un peor pronóstico (invasión de estructuras adyacentes y alto índice proliferativo). Sin embargo, dicha variable no está recogida como tal en la mayoría de trabajos publicados.

4. En la segunda fase del estudio no se han evaluado todos los subtipos de AH.

5. El tamaño muestral de cada subtipo puede condicionar que no se encuentren asociaciones estadísticamente significativas entre las variables estudiadas.

6. La variable reintervención se encuentra limitada al no poder discernir si se trata de persistencia de restos tras la primera operación o se debe al crecimiento de los mismos o recurrencia tumoral.

7. El estudio del efecto de la medicación sobre la expresión de los genes y miRNAs puede estar artefactado por la indicación preoperatoria del tratamiento.



## **IX. CONCLUSIONES**

1. La expresión de PTTG es diferente según el subtipo de AH y viene condicionada por una regulación distinta:
  - a. En los adenomas GT, E2F1 regula de forma negativa la expresión de PTTG, estando involucrado el cluster pri-miR-17\_92.
  - b. En los adenomas CTS, la expresión de PTTG está asociada de forma positiva con E2F1, involucrándose también el cluster pri-miR-17\_92.
  - c. En los adenomas ST, la expresión de PTTG podría estar regulada por los miRNAs Let-7a y cluster pri-miR-17\_92 controlados por c-myc.
  - d. En los adenomas CTF, PTTG formaría un bucle regulatorio con los miRNAs del cluster pri-miR-17\_92.
  
2. La expresión de PTTG se asocia a buen pronóstico en los adenomas GT al no venir determinada por la vía c-myc/E2F.
  
3. El factor de transcripción E2F1 se expresa de forma distinta en los AH y se asocia a mal pronóstico en los adenomas GT y ST.
  
4. El proto-onocgen c-myc se expresa de forma distinta según el subtipo de AH, estando asociado a buen pronóstico en los adenomas GT y a mal pronóstico en los adenomas ST.
  
5. El miRNA miR-17-5p podría ser un marcador de agresividad en los AH.
  
6. Los miRNAs Let-7a y miR-16-1 actúan como supresores de tumores en los AH.





## ***X. ABREVIATURAS***

AH: adenomas hipofisarios

Cnn: número de copias normalizado

COR: curva característica del receptor

CTF: adenoma corticotropo

CTS: adenoma corticotropo silente

ADN-PK: proteína- cinasa dependiente de ADN

FC: fold change

GT: adenoma gonadotropo

HMGA: High Mobility Group A

IHQ: inmunohistoquímica

LT: adenoma lactotropo

NF: adenoma no funcionante

OMS: Organización Mundial para la Salud

PTTG: pituitary transforming tumor gene

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Rb: retinoblastoma

ST: adenoma somatotropo

TT: adenoma tirotrópico

WB: western blot



## ***XI. TABLAS Y FIGURAS***

<u>Tabla II.1-1. Clasificación de la OMS de los adenomas hipofisarios.....</u>	<u>12</u>
<u>Tabla II.6-1. Características de la mayoría de estudios publicados sobre expresión de PTTG en adenomas hipofisarios.....</u>	<u>22</u>
<u>Tabla V.2-1. Ensayos de Expresión TaqMan empleados en la cuantificación mediante RT-PCR (Life Technologies).....</u>	<u>43</u>
<u>Tabla V.2-2. Clasificación molecular de los Adenomas Hipofisarios según el patrón génico de expresión y presentación clínica.....</u>	<u>44</u>
<u>Tabla V.2-3. Rangos de expresión relativa (percentiles 25-75) de los genes estudiados según el subtipo de adenoma hipofisario.....</u>	<u>45</u>
<u>Tabla VI.1-1. Características basales de los pacientes incluidos en la primera fase de estudio.....</u>	<u>50</u>
<u>Tabla VI.1-2. Características clínicas, anatomopatológicas y expresión génica de PTTG de los pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante tras la intervención.....</u>	<u>52</u>
<u>Tabla VI.2-1. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio con muestras congeladas.....</u>	<u>58</u>
<u>Tabla VI.2-2. Extensión tumoral según el subtipo de adenoma hipofisario.....</u>	<u>59</u>
<u>Tabla VI.2-3. Grado de agresividad según el subtipo de adenoma hipofisario.....</u>	<u>59</u>
<u>Tabla VI.2-4. Expresión de PTTG (fold change) en función del subtipo de adenoma hipofisario.....</u>	<u>60</u>
<u>Tabla VI.2-5. Expresión génica de E2F1, c-Myc y Pri-miR-17~92 en los diferentes subtipos de adenomas hipofisarios.....</u>	<u>63</u>
<u>Tabla VI.2-6. Expresión de los microRNAs maduros en los diferentes subtipos de adenomas hipofisarios. Significación estadística como Test de Kruskal-Wallis para las diferencias entre los subtipos.....</u>	<u>69</u>

<u>Figura II.1-1. Modelo de desarrollo de las líneas celulares adenohipofisarias determinado temporalmente por la activación de una cascada de factores de transcripción.....</u>	<u>11</u>
<u>Figura VI.1-1 Expresión de ARNm de PTTG como número de copias normalizadas (Cnn) según el subtipo histológico de adenoma hipofisario (1a) y el estado funcional (1b).....</u>	<u>53</u>
<u>Figura VI.1-2. Comparación de la expresión de PTTG como número de copias normalizadas (Cnn) entre adenomas hipofisarios intra y extraselares.....</u>	<u>54</u>
<u>Figura VI.1-3. Comparación de la expresión de PTTG (Cnn) entre adenomas hipofisarios invasivos o no invasivos: (a) adenomas funcionantes; (b) adenomas no funcionantes.....</u>	<u>55</u>
<u>Figura VI.2-1. Diferente patrón de expresión de PTTG (FC) en función del subtipo de adenoma hipofisario.....</u>	<u>60</u>
<u>Figura VI.2-2. Diferente expresión de PTTG (FC) en función de la invasividad tumoral en los adenomas gonadotropos.....</u>	<u>61</u>
<u>Figura VI.2-3. Diferente expresión de PTTG (FC) en función del grado de agresividad en la muestra global de adenomas hipofisarios.....</u>	<u>62</u>
<u>Figura VI.2-4. Tabla de frecuencias con el patrón de expresión de c-Myc (sobrexpresión, expresión normal y represión) en función del subtipo molecular de adenoma hipofisario.....</u>	<u>64</u>
<u>Figura VI.2-5. Tabla de frecuencias con el patrón de expresión de E2F1 (sobrexpresión, expresión normal y represión) en función del subtipo molecular de adenoma hipofisario.....</u>	<u>64</u>
<u>Figura VI.2-6. Diferente expresión de mRNA de E2F1 (a) y c-Myc (b) en función de la extensión tumoral en los adenomas somatotropos.....</u>	<u>65</u>
<u>Figura VI.2-7. Diferente expresión de mRNA de c-Myc (fold change) en función de la invasividad tumoral en los adenomas: a) gonadotropos; b) somatotropos.....</u>	<u>66</u>
<u>Figura VI.2-8. Diferente expresión de mRNA de c-Myc (fold change) según de la agresividad tumoral alta-media frente a baja en los adenomas: a) gonadotropos; b) somatotropos.....</u>	<u>67</u>
<u>Figura VI.2-9. Diferente expresión de mRNA de PTTG (fold change) en función de la sobreexpresión de E2F1 en los adenomas: a) gonadotropos (GT); b) corticotropos (CTF); c) somatotropos (ST); d) corticotropos silentes (CTS).....</u>	<u>69</u>
<u>Figura VI.2-10. Comparación entre los patrones de expresión de los diferentes microRNAs estudiados en función del subtipo de adenoma hipofisario: CTF, corticotropinomas; ST, somatotropinomas; GT, gonadotropinomas; CTS, corticotropinomas silentes. Los números dentro de las barras corresponden al número dentro de cada subtipo.....</u>	<u>70</u>

Figura VI.2-11. Diferente expresión de miRNA (fold change) comparando los adenomas somatotropos frente al resto. a) miR-16-1; b) miR-15a; c) Let-7a.....71

Figura VI.2-12. Diferente patrón de expresión de miR-17-5p (fold change) en la muestra global según el grado de agresividad tumoral.....72

Figura VI.2-13. Diferencias en la expresión de los diferentes miRNAs (fold change) en los adenomas corticotropos silentes en función de si habían recibido tratamiento previo con agonistas dopaminérgicos: a) miR-17-5p, b) miR-20a, c) miR-15a, d) miR-16-1.....73

Figura VI.2-14. Diferencias en la expresión de los diferentes miRNAs (fold change) en los adenomas gonadotropos en función de si habían recibido tratamiento previo con agonistas dopaminérgicos (AD): a) miR-17-5p, b) miR-20a.....74

Figura VI.2-15. Comparación de la expresión de miR-16-1 (fold change) en la muestra global en función de si se trataba o no de una reintervención....74





## **XII. BIBLIOGRAFIA**

1. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004 Aug 1;101(3):613-9.
2. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(11):1603-18.
3. DeLellis RA LR, Heitz PU & Eng C.. *World Health Organization Classification of Tumours*. . In: Press I, editor. *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs Lyon*:: IARC Press; 2004.
4. Asa SL. Practical pituitary pathology: what does the pathologist need to know? *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Aug;132(8):1231-40.
5. Fukuoka H, Takahashi Y. The role of genetic and epigenetic changes in pituitary tumorigenesis. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2014;54(12):943-57.
6. Peverelli E, Mantovani G, Lania AG, Spada A. cAMP in the pituitary: an old messenger for multiple signals. *J Mol Endocrinol*. 2014 Feb;52(1):R67-77.
7. Yu R, Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Prog Brain Res*. 2010;182:207-27.
8. Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*. 1997 Apr;11(4):433-41.
9. Kakar SS. Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG). *Gene*. 1999 Nov 29;240(2):317-24.



10. Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, et al. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*. 1999 Jan;13(1):156-66.
11. Prezant TR, Kadioglu P, Melmed S. An intronless homolog of human proto-oncogene hPTTG is expressed in pituitary tumors: evidence for hPTTG family. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Mar;84(3):1149-52.
12. Chen L, Puri R, Lefkowitz EJ, Kakar SS. Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene*. 2000 May 2;248(1-2):41-50.
13. Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd RV, Cusimano M. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer*. 2008 Sep;15(3):721-43.
14. Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrouer T, Pellestor F, Klein B, et al. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod*. 2006 Jul;21(7):1705-19.
15. Chien W, Pei L. A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product. *J Biol Chem*. 2000 Jun 23;275(25):19422-7.
16. Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene*. 2007 Aug 16;26(38):5596-605.
17. Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. Human D-type cyclin. *Cell*. 1991 May 17;65(4):691-9.
18. Tanaka T, Fuchs J, Loidl J, Nasmyth K. Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. *Nat Cell Biol*. 2000 Aug;2(8):492-9.

19. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. Science. 1999 Jul 16;285(5426):418-22.
20. Boelaert K, Yu R, Tannahill LA, Stratford AL, Khanim FL, Eggo MC, et al. PTTG's C-terminal PXXP motifs modulate critical cellular processes in vitro. J Mol Endocrinol. 2004 Dec;33(3):663-77.
21. Romero F, Multon MC, Ramos-Morales F, Dominguez A, Bernal JA, Pintor-Toro JA, et al. Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the ADN-dependent protein kinase. Nucleic Acids Res. 2001 Mar 15;29(6):1300-7.
22. Yu R, Heaney AP, Lu W, Chen J, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. J Biol Chem. 2000 Nov 24;275(47):36502-5.
23. Bernal JA, Luna R, Espina A, Lazaro I, Ramos-Morales F, Romero F, et al. Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. Nat Genet. 2002 Oct;32(2):306-11.
24. Hamid T, Kakar SS. PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. Mol Cancer. 2004 Jul 8;3:18.
25. Chesnokova V, Melmed S. Pituitary tumour-transforming gene (PTTG) and pituitary senescence. Horm Res. 2009 Apr;71 Suppl 2:82-7.
26. Heaney AP, Fernando M, Melmed S. Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. J Clin Invest. 2002 Jan;109(2):277-83.
27. Heaney AP, Melmed S. Pituitary tumour transforming gene: a novel factor in pituitary tumour formation. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 1999 Oct;13(3):367-80.

28. Yin H, Fujimoto N, Maruyama S, Asano K. Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in estrogen-induced pituitary tumorigenesis in rats. *Jpn J Cancer Res.* 2001 Oct;92(10):1034-40.
29. Heaney AP, Nelson V, Fernando M, Horwitz G. Transforming events in thyroid tumorigenesis and their association with follicular lesions. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Oct;86(10):5025-32.
30. Thompson AD, 3rd, Kakar SS. Insulin and IGF-1 regulate the expression of the pituitary tumor transforming gene (PTTG) in breast tumor cells. *FEBS Lett.* 2005 Jun 6;579(14):3195-200.
31. Chamaon K, Kanakis D, Mawrin C, Dietzmann K, Kirches E. Transcripts of PTTG and growth factors bFGF and IGF-1 are correlated in pituitary adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010 Feb;118(2):121-6.
32. Chamaon K, Kirches E, Kanakis D, Braeuninger S, Dietzmann K, Mawrin C. Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and non-neoplastic astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 May 27;331(1):86-92.
33. Vlotides G, Cruz-Soto M, Rubinek T, Eigler T, Auernhammer CJ, Melmed S. Mechanisms for growth factor-induced pituitary tumor transforming gene-1 expression in pituitary folliculostellate TtT/GF cells. *Mol Endocrinol.* 2006 Dec;20(12):3321-35.
34. Clem AL, Hamid T, Kakar SS. Characterization of the role of Sp1 and NF-Y in differential regulation of PTTG/securin expression in tumor cells. *Gene.* 2003 Dec 11;322:113-21.
35. Zhou Y, Mehta KR, Choi AP, Scolavino S, Zhang X. ADN damage-induced inhibition of securin expression is mediated by p53. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3;278(1):462-70.
36. Zhou C, Wawrowsky K, Bannykh S, Gutman S, Melmed S. E2F1 induces pituitary tumor transforming gene (PTTG1) expression in human pituitary tumors. *Mol Endocrinol.* 2009 Dec;23(12):2000-12.

37. Emmrich S, Putzer BM. Checks and balances: E2F-microRNA crosstalk in cancer control. Cell Cycle. 2010 Jul 1;9(13):2555-67.
38. Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, et al. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. Nature. 2001 Nov 22;414(6862):457-62.
39. Collier HA, Forman JJ, Legesse-Miller A. "Myc'ed messages": myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron. PLoS Genet. 2007 Aug;3(8):e146.
40. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature. 2005 Jun 9;435(7043):839-43.
41. Pickering MT, Stadler BM, Kowalik TF. miR-17 and miR-20a temper an E2F1-induced G1 checkpoint to regulate cell cycle progression. Oncogene. 2009 Jan 8;28(1):140-5.
42. Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, et al. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. J Biol Chem. 2007 Jan 26;282(4):2135-43.
43. Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. J Biol Chem. 2007 Jan 26;282(4):2130-4.
44. Zhou C, Liu S, Zhou X, Xue L, Quan L, Lu N, et al. Overexpression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG), is regulated by beta-catenin /TCF pathway in human esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer. 2005 Mar 1;113(6):891-8.
45. Gueorguiev M, Grossman AB. Pituitary gland and beta-catenin signaling: from ontogeny to oncogenesis. Pituitary. 2009;12(3):245-55.

46. Hlubek F, Pfeiffer S, Budczies J, Spaderna S, Jung A, Kirchner T, et al. Securin (hPTTG1) expression is regulated by beta-catenin/TCF in human colorectal carcinoma. Br J Cancer. 2006 Jun 5;94(11):1672-7.
47. Vlotides G, Eigler T, Melmed S. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. Endocr Rev. 2007 Apr;28(2):165-86.
48. Mete O, Ezzat S, Asa SL. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. J Mol Endocrinol. 2012 Oct;49(2):R69-78.
49. Li T, Huang H, Huang B, Lu J. Histone acetyltransferase p300 regulates the expression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG). J Genet Genomics. 2009 Jun;36(6):335-42.
50. Hidalgo M, Galan JJ, Saez C, Ferrero E, Castilla C, Ramirez-Lorca R, et al. Methylation alterations are not a major cause of PTTG1 misregulation. BMC Cancer. 2008;8:110.
51. Pei L. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function. J Biol Chem. 2000 Oct 6;275(40):31191-8.
52. Ramos-Morales F, Dominguez A, Romero F, Luna R, Multon MC, Pintor-Toro JA, et al. Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. Oncogene. 2000 Jan 20;19(3):403-9.
53. Wang Z, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) transforming and transactivation activity. J Biol Chem. 2000 Mar 17;275(11):7459-61.
54. Abbud RA, Takumi I, Barker EM, Ren SG, Chen DY, Wawrowsky K, et al. Early multipotential pituitary focal hyperplasia in the alpha-subunit of glycoprotein hormone-driven pituitary tumor-transforming gene transgenic mice. Mol Endocrinol. 2005 May;19(5):1383-91.

55. Kim DS, Fong J, Read ML, McCabe CJ. The emerging role of pituitary tumour transforming gene (PTTG) in endocrine tumorigenesis. Mol Cell Endocrinol. 2007 Nov 15;278(1-2):1-6.

56. Boelaert K, Tannahill LA, Bulmer JN, Kachilele S, Chan SY, Kim D, et al. A potential role for PTTG/securin in the developing human fetal brain. FASEB J. 2003 Sep;17(12):1631-9.

57. Pei L. Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene. J Biol Chem. 2001 Mar 16;276(11):8484-91.

58. Yu R, Lu W, Chen J, McCabe CJ, Melmed S. Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells. Endocrinology. 2003 Nov;144(11):4991-8.

59. Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Feb;84(2):761-7.

60. Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA, Melmed S. Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 2001 Feb;86(2):867-74.

61. Hunter JA, Skelly RH, Aylwin SJ, Geddes JF, Evanson J, Besser GM, et al. The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas. Eur J Endocrinol. 2003 Feb;148(2):203-11.

62. McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, et al. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. Clin Endocrinol (Oxf). 2003 Feb;58(2):141-50.

63. Filippella M, Galland F, Kujas M, Young J, Faggiano A, Lombardi G, et al. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. Clin Endocrinol (Oxf). 2006 Oct;65(4):536-43.

64. Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Sep;14(3):887-900.

65. Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol*. 2006 Summer;17(2):143-53.

66. Tena-Suck ML, Ortiz-Plata A, de la Vega HA. Phosphatase and tensin homologue and pituitary tumor-transforming gene in pituitary adenomas. Clinical-pathologic and immunohistochemical analysis. *Ann Diagn Pathol*. 2008 Aug;12(4):275-82.

67. Noh TW, Jeong HJ, Lee MK, Kim TS, Kim SH, Lee EJ. Predicting recurrence of nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Nov;94(11):4406-13.

68. Raverot G, Wierinckx A, Dantony E, Auger C, Chapas G, Villeneuve L, et al. Prognostic factors in prolactin pituitary tumors: clinical, histological, and molecular data from a series of 94 patients with a long postoperative follow-up. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Apr;95(4):1708-16.

69. Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Cantelmi D, Horvath E, Lloyd RV, et al. Immunohistochemical expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in pituitary adenomas: a correlative study of tumor subtypes. *Int J Surg Pathol*. 2010 Feb;18(1):5-13.

70. Jia W, Lu R, Jia G, Ni M, Xu Z. Expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in human pituitary macroadenomas. *Tumour Biol*. 2013 Jun;34(3):1559-67.

71. Li Y, Zhou LP, Ma P, Sui CG, Meng FD, Tian X, et al. Relationship of PTTG expression with tumor invasiveness and microvessel density of pituitary adenomas: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014 Apr;18(4):279-85.

72. Xiao JQ, Liu XH, Hou B, Yao Y, Deng K, Feng M, et al. Correlations of pituitary tumor transforming gene expression with human pituitary adenomas: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(3):e90396.

73. Horwitz GA, Miklovsy I, Heaney AP, Ren SG, Melmed S. Human pituitary tumor-transforming gene (PTTG1) motif suppresses prolactin expression. Mol Endocrinol. 2003 Apr;17(4):600-9.

74. Cristina C, Diaz-Torga GS, Goya RG, Kakar SS, Perez-Millan MI, Passos VO, et al. PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. Mol Cancer. 2007;6:4.

75. Passos VO, Fortes MA, Giannella-Neto D, Bronstein MD. Genes differentially expressed in prolactinomas responsive and resistant to dopamine agonists. Neuroendocrinology. 2009;89(2):163-70.

76. Trouillas J. In search of a prognostic classification of endocrine pituitary tumors. Endocr Pathol. 2014 Jun;25(2):124-32.

77. Kontogeorgos G. New horizons in diagnosis and management of endocrine tumors. Cancer Biomark. 2014;14(2-3):163-7.

78. Mete O, Asa SL. Therapeutic implications of accurate classification of pituitary adenomas. Semin Diagn Pathol. 2013 Aug;30(3):158-64.

79. Tong Y, Zheng Y, Zhou J, Oyesiku NM, Koeffler HP, Melmed S. Genomic characterization of human and rat prolactinomas. Endocrinology. 2012 Aug;153(8):3679-91.

80. Fedele M, Pierantoni GM, Visone R, Fusco A. E2F1 activation is responsible for pituitary adenomas induced by HMGA2 gene overexpression. Cell Div. 2006;1:17.

81. D'Angelo D, Palmieri D, Mussnich P, Roche M, Wierinckx A, Raverot G, et al. Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Jul;97(7):E1128-38.

82. Fedele M, Visone R, De Martino I, Troncone G, Palmieri D, Battista S, et al. HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity. Cancer Cell. 2006 Jun;9(6):459-71.



83. Palmieri D, D'Angelo D, Valentino T, De Martino I, Ferraro A, Wierinckx A, et al. Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis. *Oncogene*. 2012 Aug 23;31(34):3857-65.

84. Fedele M, Palmieri D, Fusco A. HMGA2: A pituitary tumour subtype-specific oncogene? *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Sep 15;326(1-2):19-24.

85. Olson MV, Johnson DG, Jiang H, Xu J, Alonso MM, Aldape KD, et al. Transgenic E2F1 expression in the mouse brain induces a human-like bimodal pattern of tumors. *Cancer Res*. 2007 May 1;67(9):4005-9.

86. Knoll S, Emmrich S, Putzer BM. The E2F1-miRNA cancer progression network. *Adv Exp Med Biol*. 2013;774:135-47.

87. Lu Z, Bauzon F, Fu H, Cui J, Zhao H, Nakayama K, et al. Skp2 suppresses apoptosis in Rb1-deficient tumours by limiting E2F1 activity. *Nat Commun*. 2014;5:3463.

88. Toki H, Inoue M, Minowa O, Motegi H, Saiki Y, Wakana S, et al. Novel retinoblastoma mutation abrogating the interaction to E2F2/3, but not E2F1, led to selective suppression of thyroid tumors. *Cancer Sci*. 2014 Oct;105(10):1360-8.

89. Zhang Y, Chen L, Yang S, Fang D. E2F1: a potential negative regulator of hTERT transcription in normal cells upon activation of oncogenic c-Myc. *Med Sci Monit*. 2012 Jan;18(1):RA12-5.

90. Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Jun;4(6).

91. Boggild MD, Jenkinson S, Pistorello M, Boscaro M, Scanarini M, McTernan P, et al. Molecular genetic studies of sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Feb;78(2):387-92.

92. Woloschak M, Roberts JL, Post K. c-myc, c-fos, and c-myb gene expression in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Jul;79(1):253-7.

93. Dworakowska D, Wlodek E, Leontiou CA, Igreja S, Cakir M, Teng M, et al. Activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in pituitary adenomas and their effects on downstream effectors. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Dec;16(4):1329-38.
94. Avraham R, Yarden Y. Regulation of signalling by microRNAs. *Biochem Soc Trans*. 2012 Feb;40(1):26-30.
95. Palmero EI, de Campos SG, Campos M, de Souza NC, Guerreiro ID, Carvalho AL, et al. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genet Mol Biol*. 2011 Jul;34(3):363-70.
96. Sotiropoulou G, Pampalakis G, Lianidou E, Mourelatos Z. Emerging roles of microRNAs as molecular switches in the integrated circuit of the cancer cell. *RNA*. 2009 Aug;15(8):1443-61.
97. Cloonan N, Brown MK, Steptoe AL, Wani S, Chan WL, Forrest AR, et al. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol*. 2008;9(8):R127.
98. Aguda BD, Kim Y, Piper-Hunter MG, Friedman A, Marsh CB. MicroRNA regulation of a cancer network: consequences of the feedback loops involving miR-17-92, E2F, and Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 16;105(50):19678-83.
99. Lotterman CD, Kent OA, Mendell JT. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle*. 2008 Aug 15;7(16):2493-9.
100. Morris DG, Musat M, Czirjak S, Hanzely Z, Lillington DM, Korbonits M, et al. Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis. *Eur J Endocrinol*. 2005 Jul;153(1):143-51.
101. Liu Y, Yin B, Zhang C, Zhou L, Fan J. Hsa-let-7a functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma cell lines by targeting c-myc. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 6;417(1):371-5.

102. Qian ZR, Asa SL, Siomi H, Siomi MC, Yoshimoto K, Yamada S, et al. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. Mod Pathol. 2009 Mar;22(3):431-41.

103. Amaral FC, Torres N, Saggioro F, Neder L, Machado HR, Silva WA, Jr., et al. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Jan;94(1):320-3.

104. Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. Cell Death Differ. 2010 Feb;17(2):215-20.

105. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. J Cell Physiol. 2005 Jul;204(1):280-5.

106. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. Nat Med. 2008 Nov;14(11):1271-7.

107. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 27;102(39):13944-9.

108. Renjie W, Haiqian L. MiR-132, miR-15a and miR-16 synergistically inhibit pituitary tumor cell proliferation, invasion and migration by targeting Sox5. Cancer Lett. 2015 Jan 28;356(2 Pt B):568-78.





### ***XIII. ANEXOS***

## Anexo 1. Consentimientos informados

A1. Consentimiento informado específico

A2. Consentimiento informado Biobanco



## **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

### **"INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE"**

#### **TÍTULO DEL PROYECTO:**

Regulación del Pituitary Tumor-Transforming Gene (PTTG)  
Asociada al E2F1 y a MicroRNAs en Adenomas Hipofisarios

#### **Investigador Principal:**

Dr. Antonio Pico Alfonso (Hospital General Universitario de Alicante)

#### **Investigadores colaboradores:**

Dra. Carmen Fajardo Montaña, Servicio Endocrinología, Hospital La Ribera.  
Dr. Pedro Antonio Riesgo Suárez, Servicio Neurocirugía, Hospital La Ribera.  
Dr. Pedro Moreno, Servicio Neurocirugía, Hospital Gral. Univ. Alicante.  
Dra. María Niveiro de Jaime, Servicio Patología, Hospital Gral. Univ. Alicante.  
Ruth Sánchez-Ortiga, Servicio Endocrinología, Hospital Gral. Univ. Alicante.  
Laura Sánchez Tejada, Unidad de Investigación, Hospital Gral. Univ. Alicante.

LA REGULACIÓN AUTONÓMICA REQUIERE EL CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO DE LOS PARTICIPANTES PARA FORMAR PARTE EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN, DONDE ESTOS PUEDAN DECIDIR SI PARTICIPAN O NO, PARA HACERLO DE UNA FORMA LIBRE Y DE MANERA INFORMADA. EL INVESTIGADOR ESTÁ OBLIGADO A LEER LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO Y ASEGURARSE DE QUE USTED, SI DA SU CONSENTIMIENTO, ESTÁ INFORMADO DE LA NATURALEZA DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN Y DE CÓMO SERÁ SU PARTICIPACIÓN. FIRMANDO ESTE DOCUMENTO INDICARÁ QUE HA SIDO DEBIDAMENTE INFORMADO Y QUE DA SU CONSENTIMIENTO.

#### **Finalidad:**

Va a formar parte de un estudio de investigación que trata del estudio molecular de señales implicadas en la regulación (patofisiológica de la glándula hipofisaria tumoral y si como consecuencia del reconocimiento de dichos marcadores existe la posible utilidad y relevancia en el tratamiento terapéutico y/o diagnóstico precoz de la patología correspondiente.

#### **Descripción del proceso/Procedimiento:**

La inclusión en el estudio no requiere la realización de ninguna prueba adicional. Consiste en la obtención de parte del material del tumor extirpado, una vez se haya recogido la muestra necesaria para que

Anatomía Patológica haga el diagnóstico histológico. Parte del material será procesado y guardado según la metodología descrita en el proyecto de investigación y aceptada por el Comité Ético del Hospital General Universitario de Alicante. Si el paciente lo solicitase se le informará de los resultados obtenidos a través de informe escrito.

#### **Beneficios:**

Usted no obtendrá ningún beneficio inmediato de la participación en este estudio. Sin embargo, de los resultados de este estudio se pretenden definir mejores estrategias de tratamiento y vigilancia en los casos de adenomas hipofisarios.

#### **Riesgos o posibles efectos secundarios:**

La participación en este estudio no conlleva ningún tipo de riesgo.

#### **Participación voluntaria:**

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Usted es libre de retirarse del estudio en cualquier momento si así lo cree conveniente, sin tener que especificar los motivos y sin que su decisión perjudique en el futuro la atención médica que merece.

#### **Confidencialidad:**

Aunque los datos de este estudio pueden ser publicados, se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con los participantes. Los registros de los datos personales y de los resultados no serán en ningún caso divulgados y solo estarán a disposición de la administración como se recoge en la regulación de los estudios de investigación (L.O. 15/1999 de protección de datos de carácter personal). Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital General Universitario de Alicante.

#### **Información:**

El responsable del estudio (Dr.:.....) es médico de plantilla de este Hospital y le dará toda la información complementaria del estudio que Usted desee. Dicho doctor puede ser contactado llamando al teléfono:..... Las muestras obtenidas no serán utilizadas para ninguna finalidad empresarial o que pueda implicar la obtención de beneficios económicos.

DECLARACIONES Y FIRMAS:

**. Declaración del enfermo:**

- He sido informado por el médico de:
  - Las ventajas e inconvenientes del procedimiento arriba indicado
  - Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento
- He comprendido la información recibida y podido formular todas las preguntas que he creído oportunas
- Se me hace entrega de una copia de este documento.
- Estoy de acuerdo en participar en este estudio de investigación.

Nombre.....

Firma: .....

**. Declaración del médico, de que ha informado debidamente al paciente.**

Nombre .....

Firma .....

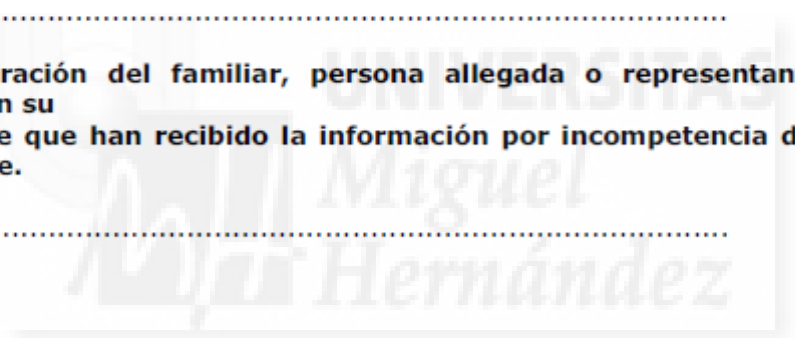
**. Declaración del familiar, persona allegada o representante legal, en su caso, de que han recibido la información por incompetencia del paciente.**

Nombre .....

Firma .....

**. Declaración de testigo, en su caso**

Nombre .....





## Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para investigación al biobanco del...

(2 de 6)

### 5. Derecho de revocación del consentimiento

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, podrá decidir que sean destruidas o anonimizadas. Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

### 6. Riesgos

La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en las zonas de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

### 7. Protección de datos personales y confidencialidad

Los datos personales y de salud obtenidos de su historia clínica o equivalente serán incorporados y tratados en una base de datos que cumple con las garantías que establece la legislación sanitaria y sobre protección de datos de carácter personal.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

Es posible que en el desarrollo de un proyecto de investigación se genere mucha información genética de sus muestras. Si los resultados fueran relevantes desde el punto de vista científico, la información obtenida, desligada de cualquier dato que pueda permitir su identificación por medios razonables, podría ser remitida para su inclusión en bases científicas y demás medios de difusión de contenido científico a los que tendrán acceso, con carácter restringido, investigadores científicos.

El biobanco en el que se custodiarán sus muestras forma parte de la Red Valenciana de Biobancos cuya coordinación es llevada a cabo por el Centro Superior de Investigación de Salud Pública de la Comunitat Valenciana.

Como consecuencia de lo anterior, el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos, esto es, el Centro Superior de Investigación en Salud Pública de la Comunitat Valenciana, tendrá acceso a sus datos personales y a la información clínica asociada a la muestra donada voluntariamente, con el único fin de cumplir con las labores atribuidas a la Red Valenciana de Biobancos en virtud de la legislación vigente. En particular, el eventual acceso a sus datos personales por parte de la Red Valenciana de Biobancos tendrá como finalidad poder coordinar de la manera más eficiente posible desde el punto de vista científico la información obtenida por los biobancos adscritos a la Red Valenciana de Biobancos, mediante la gestión y coordinación del Sistema de Gestión de la Información de la Red Valenciana de Biobancos, así como la coordinación de las actividades desarrolladas por los biobancos, todo ello de acuerdo con la normativa aplicable.

Podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, para lo cual tiene en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Centro responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.

### 8. Seguro

Los profesionales de enfermería que colaboran con el biobanco tienen un seguro de responsabilidad civil con \_\_\_\_\_, concertado con \_\_\_\_\_  
Poliza Nº: \_\_\_\_\_ que cubre el acto profesional, en este caso la extracción, y por tanto también las extracciones realizadas con fines de investigación.





### EJEMPLAR PARA EL BIOBANCO

#### Declaración de consentimiento

D./Dª ..... de ..... años de edad, con domicilio en .....

DNI ..... y nº de SIP .....

D./Dª ..... de ..... años de edad, con domicilio en.....

DNI ..... en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente con DNI ..... y nº de SIP .....

#### DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de .....

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas: .....

#### CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª .....  
DNI: .....

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./Dª .....  
DNI: .....  
Colegiado Nº: .....  
En condición de: .....

En ..... a ..... de ..... de 20.....

Consentimiento informado para la donación voluntaria  
de muestras biológicas para investigación  
al biobanco del...

(4 de 6)

EJEMPLAR PARA EL DONANTE

Declaración de consentimiento

D./D<sup>a</sup> ..... de ..... años de edad, con domicilio en .....

DNI ..... y nº de SIP .....

D./D<sup>a</sup> ..... de ..... años de edad, con domicilio en .....

DNI ..... en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad)  
del paciente con DNI ..... y nº de SIP .....

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de .....

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas: .....

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./D<sup>a</sup> .....  
DNI: .....

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./D<sup>a</sup> .....  
DNI: .....  
Colegiado N<sup>o</sup>: .....  
En condición de: .....

En ..... a ..... de ..... de 20.....



RED VALENCIANA DE BIOBANCOS



### EJEMPLAR PARA EL CENTRO

#### Declaración de consentimiento

D./Dª ..... de ..... años de edad, con domicilio en .....

DNI ..... y nº de SIP .....

D./Dª ..... de ..... años de edad, con domicilio en.....

DNI ..... en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad)  
del paciente con DNI ..... y nº de SIP .....

#### DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de .....

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas: .....

#### CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª .....  
DNI: .....

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./Dª .....  
DNI: .....  
Colegiado N°: .....  
En condición de: .....

En ..... a ..... de ..... de 20.....

Consentimiento informado para la donación voluntaria  
de muestras biológicas para investigación  
al biobanco del...  
(6 de 6)

Revocación del consentimiento

Revoco el consentimiento prestado en fecha ..... de ..... de 2..... y no  
deseo proseguir la donación voluntaria que doy con esta fecha por finalizada.

A completar por el donante:

Fdo.: D./Dª .....  
DNI: .....

A completar por el profesional de salud

Fdo.: D./Dª .....  
DNI: .....  
Colegiado Nº: .....  
En condición de: .....

En ..... a ..... de ..... de 20.....



RED VALENCIANA DE BIOBANCOS

## Anexo 2. Publicaciones producto de esta tesis

**A2.1.** Rol of pituitary tumour-transforming gene (PTTG) in the pituitary adenomas. Sánchez-Ortiga R, Sánchez Tejada L, Peiró Cabrera G, Moreno-Pérez O, Arias Mendoza N, Aranda López FI, Picó Alfonso A. *Endocrinol Nutr.* 2010 Jan;57(1):28-34. doi: 10.1016/S1575-0922(10)70006-1. Review. Spanish. PMID: 20172484

**A2.2.** Pituitary tumor transforming gene and insulin-like growth factor 1 receptor expression and immunohistochemical measurement of Ki-67 as potential prognostic markers of pituitary tumors aggressiveness. Sánchez-Tejada L, Sánchez-Ortiga R, Moreno-Pérez O, Montañana CF, Niveiro M, Tritos NA, Alfonso AM. *Endocrinol Nutr.* 2013 Aug-Sep;60(7):358-67. doi: 10.1016/j.endonu.2012.09.005. Epub 2013 Feb 15. PMID: 23416216 **(PREMIO MEJOR ARTÍCULO ORIGINAL PUBLICADO EN LA REVISTA ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN)**

### Comunicaciones a Congresos

**A2.3.** Contribution of the Molecular Biology to the Study of the Behaviour of Pituitary Adenomas. Sánchez-Tejada L<sup>1</sup>, Sánchez-Ortiga R<sup>2</sup>, Niveiro M<sup>3</sup>, Peiro G<sup>1</sup>, Moreno O<sup>2</sup>, Aranda I<sup>3</sup>, Pico Alfonso A.A<sup>2</sup> European Congress of Endocrinology April 2010; Prague, Czech Republic.

**A2.4.** Molecular markers as prognostic indicator of the behavior of the Pituitary Adenomas. Ruth Sanchez-Ortiga, MD1; Laura Sanchez-Tejada, MD2; Oscar Moreno-Perez, MD1; Maria Niveiro, MD3; Carmen Fajardo, MD4; Pedro Riesgo, MD5 and Antonio Pico, MD1. <sup>1</sup>Endocrinology, <sup>2</sup>Research Unit, <sup>3</sup>PathologyHospital General Universitario Alicante (HGUA), Alicante, Spain. <sup>4</sup>Endocrinology, <sup>5</sup>Neurosurgery, Hospital La Ribera, Alzira, Valencia, Spain. ENDO 2011; June 2011, Boston, USA.

**A2.5** Molecular classification of pituitary adenomas. Antonio Picó1, Laura Sanchez-Tejada5, Ruth Sanchez-Ortiga1, Rosa Cámara4, Cristina Lamas2, Javier Abarca6, Irene Monjas7, Pedro Riesgo8 & Carmen Fajardo3. *Endocrine Abstracts* (2015) 37 GP18.09 European Congress of Endocrinology May 2015; Dublin, Ireland.



## REVISIÓN

### Papel de *pituitary tumour-transforming gene (PTTG)* en los adenomas hipofisarios

Ruth Sánchez-Ortiga<sup>a</sup>, Laura Sánchez Tejada<sup>b</sup>, Gloria Peiró Cabrera<sup>b</sup>, Oscar Moreno-Pérez<sup>a</sup>, Nieves Arias Mendoza<sup>c</sup>, F. Ignacio Aranda López<sup>b</sup> y Antonio Picó Alfonso<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Sección de Endocrinología y Nutrición, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España

<sup>b</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España

<sup>c</sup>Sección de Endocrinología y Nutrición, Hospital de Elda, Alicante, España

Recibido el 12 de noviembre de 2009; aceptado el 10 de diciembre de 2009

#### PALABRAS CLAVE

*PTTG*;  
Adenoma hipofisario;  
Tumor hipofisario;  
Pronóstico

#### Resumen

El *pituitary transforming tumour gene (PTTG)* está involucrado en una gran variedad de mecanismos fisiológicos. Se ha descrito sobreexpresión proteínica de *PTTG* en múltiples neoplasias, como los tumores hipofisarios, la cual favorece la aneuploidía, la inestabilidad genética, la proliferación celular y la angiogénesis, todos ellos procesos clave en la transformación neoplásica. Los estudios llevados a cabo en adenomas hipofisarios indican su asociación con un mayor grado de infiltración y de recidivas. Actualmente se plantea su función potencial como diana terapéutica.

© 2009 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

#### KEYWORDS

*PTTG*;  
Pituitary adenoma;  
Pituitary tumour;  
Outcome

#### Rol of *Pituitary Tumour-Transforming Gene (PTTG)* in the pituitary adenomas

#### Abstract

The pathogenesis of pituitary tumours is far to be understood. *Pituitary transforming tumour gene (PTTG)*, a gen that induces aneuploidy, genetic instability, cellular proliferation and to stimulate angiogenesis, has been involved in neoplastic transformation and shown overexpressed in many neoplasm as lung, breast, endometrium, thyroid and colon malignant tumours. On the other hand, *PTTG* has been inconsistently studied in pituitary tumours. The majority of studies have been performed in animals and there is a great variability in the methods used in its determination. The goal of this review is to resume the role of *PTTG* in tumorigenesis and critically to revise the studies published in humans in order to advance in the knowledge of the pathogenesis of pituitary adenomas and to find clinical useful predictors of the behavior of these tumours.

© 2009 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: pico\_ant@gva.es (A. Picó Alfonso).

## Introducción

Los adenomas hipofisarios son la causa más frecuente de tumores en la región selar, aproximadamente el 10-15% de las neoplasias intracraneales. Se originan por la expansión monoclonal de células adenohipofisarias y clínicamente se expresan por exceso de secreción hormonal, efectos compresivos debidos a expansión local o hipofunción adenohipofisaria por afección de la glándula sana<sup>1</sup>.

La patogenia de estos tumores continúa siendo objeto de estudio. Desde la descripción del *pituitary transforming tumour gene (PTTG)* en células tumorales hipofisarias en ratas GH4 en 1997<sup>2</sup>, se lo ha involucrado en los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de los adenomas hipofisarios, así como de muchas otras neoplasias.

Los objetivos de esta revisión son determinar el papel del *PTTG* en la génesis de los adenomas hipofisarios, conocer si la sobreexpresión de *PTTG* se asocia a fenotipos característicos y esclarecer las implicaciones clínicas de la detección de *PTTG* en este tipo de tumores. Se diseñó una búsqueda en PubMed mediante las palabras clave "[PTTG] and [pituitary]". Se revisaron estudios de la Fundación Cochrane. La búsqueda se limitó a estudios en humanos (última búsqueda, 23 de octubre de 2009) y se obtuvieron 12 artículos entre 1999 y 2009, que se correspondían con los criterios de selección enumerados (tabla 1).

## Familia *PTTG*

La familia *PTTG* está formada por tres genes diferentes, cada uno de ellos localizado en distintos cromosomas: *PTTG1*, localizado en el cromosoma 5q35.13 (aunque hay controversia, puesto que también se ha situado en 5q334); *PTTG2*, en 4p15.15 y *PTTG3*, en 8q13.16. En humanos existe una fuerte homología estructural (mayor del 89%) entre ellos. *PTTG1* es el más abundante y está ampliamente distribuido en tejidos sanos como el hígado fetal, los testículos y el timo, y se expresa en menor proporción en el colon, el intestino delgado, el cerebro (incluida la hipófisis), la placenta y el páncreas. *PTTG2* se ha detectado en pequeñas cantidades en el cerebro, la placenta, el intestino delgado, el colon, el hígado, el bazo, el timo, la próstata, los testículos y los ovarios, pero se ha comprobado su expresión en tumores hipofisarios, hepáticos, testiculares y ováricos<sup>7</sup>. *PTTG3* se ha relacionado con la maduración de los ovocitos y se ha detectado en neoplasias ováricas<sup>8</sup>.

Esta revisión se centrará en el comportamiento de *PTTG1*, el más abundante y estudiado, que denominaremos *PTTG*.

## Función de *PTTG*

La proteína *PTTG* puede detectarse tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. Su translocación al núcleo está mediada por el *PTTG-binding factor (PBF)* y por la vía de la proteínasa activada por mitógeno (*MAPK*)<sup>9</sup>. Las funciones enumeradas a continuación las lleva a cabo en su localización nuclear, mientras que su papel en el citoplasma permanece sin identificar<sup>3</sup> (fig. 1).

**Tabla 1** Descripción de los estudios realizados con adenomas hipofisarios humanos

Autor	Adenomas, n	Determinación	Año
Zhang et al <sup>41</sup>	54	PCR-RT	1999
McCabe et al <sup>43</sup>	103	PCR-RT, WB	2002
McCabe et al <sup>44</sup>	103	PCR-RT, WB	2003
Hunter et al <sup>45</sup>	40	PCR	2003
Filipella et al <sup>46</sup>	45	IHQ	2006
Minematsu et al <sup>47</sup>	101	IHQ, PCR-RT	2006
Cristina et al <sup>48</sup>	20	PCR-RT	2007
Wierinckx et al <sup>49</sup>	25	IHQ, PCR-RT	2007
Tena Suck et al <sup>50</sup>	49	IHQ	2008
Chesnokova et al <sup>51</sup>	77	PCR-RT	2008
Passos et al <sup>52</sup>	17	PCR-RT	2009
Chamaon et al <sup>24</sup>	103	PCR-RT	2009

IHQ: inmunohistoquímica; PCR-RT: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; WB: *Western blot*.

## Regulación del ciclo celular

Recientemente se ha correlacionado el *PTTG* con la regulación de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. Para ello, forma un complejo con el factor de transcripción Sp1, que regulando la expresión de la ciclina D3<sup>10</sup>. Las ciclinas, elementos reguladores de las cinasas dependientes de ciclina (cdk), regulan en último lugar el ciclo celular mediante la fosforilación de diferentes sustratos. La presencia de las ciclinas D es necesaria para la progresión de la fase G1<sup>11</sup>.

## Securina

*PTTG* tiene un importante papel durante la mitosis. En la metafase, los pares de cromátidas hermanas permanecen unidas mediante el complejo cohesina, lo que facilita su orientación correcta en el huso mitótico<sup>12</sup>. Este complejo se degrada mediante una separina en la transición hacia la anafase, lo que permite la disyunción de las cromátidas hermanas para dar lugar a células hijas diploides. *PTTG* se une a la separina durante la metafase e impide la degradación del complejo cohesina y la separación precoz de las cromátidas hermanas<sup>13</sup>.

## Transactivación. Factor de transcripción

Estudios en levaduras, roedores e *in vitro* han demostrado la capacidad de *PTTG* como factor transactivador de determinados genes. Se ha comprobado su función como factor de transcripción en 400 de 700 genes estudiados, implicados la mayoría de ellos en la regulación del ciclo celular y el control metabólico y de señales de transducción<sup>14</sup>. Uno de los más estudiados es el factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2), que incrementa su acción angiogénica y promitótica<sup>15</sup>. También se lo ha relacionado con el aumento de expresión de la metaloproteínasa matricial 2 (MMP2), que favorece la capacidad de invasión tumoral<sup>14</sup>.



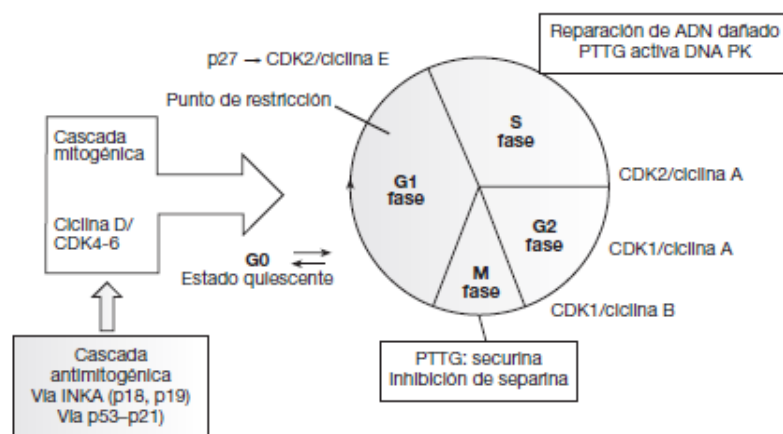


Figura 1 Esquema del papel del PTTG en el control del ciclo celular. DNA-PK: fosfocinasa de ADN; M: mitosis, G1 y G2 (fases gap); S: fase de síntesis.

### Reparación ADN

PTTG se une a la subunidad Ku-70 que regula la actividad de la proteincinasa dependiente del ADN (DNA-PK), implicada en la reparación de las roturas de ADN. Esta unión se inhibe por roturas de doble cadena del ADN, con lo que esta subunidad se activa iniciando los mecanismos de reparación. Al mismo tiempo, debido a su acción securina, inhibe la separación de las cromátidas hermanas retrasando la mitosis mientras se produce la reparación del ADN<sup>16</sup>.

### Apoptosis

La sobreexpresión de PTTG puede inducir apoptosis dependiente o independiente de p53. Además, PTTG regula la expresión del oncogén *c-myc*, que a su vez interactúa con el promotor de p53 y potencia su transcripción<sup>14</sup>. PTTG estimula directamente a Bax, que promueve también la apoptosis por la vía mitocondrial. Los mecanismos mediante los cuales causa apoptosis independientemente de p53 no están claros<sup>17,18</sup>. Sin embargo, estudios en cultivos celulares utilizando *short interfering RNA* (siRNA), cuya función es disminuir la expresión de PTTG, o mediante la transfección de PTTG, con lo que se induce su sobreexpresión, muestran una relación inversa entre la expresión de PTTG y p53<sup>7</sup>.

### Senescencia

Las células pueden responder a situaciones de estrés en el ADN entrando en apoptosis o mediante la proliferación detenida (también llamada senescencia celular). Como se ha descrito anteriormente, PTTG puede promover la transcripción de p53, lo que a su vez estimula la expresión de p21 en situaciones de estrés celular. p21 es un inhibidor de cinasas dependiente de ciclina que inhibe la formación de los complejos ciclina-CDK2 o CDK4. Además, regula la progresión de la fase G1 activando la senescencia en células inestables o aneuploides, la replicación del ADN, así como la entrada de las células en apoptosis. Por estos mecanismos, controla

el crecimiento tumoral e impide la transformación maligna en determinados tejidos como la hipófisis<sup>19</sup>.

### Regulación de la expresión de PTTG

Estudios *in vitro* y en roedores han demostrado la importancia de determinadas sustancias en la regulación de la expresión de PTTG. Los estrógenos aumentan la expresión de ARNm de PTTG, aunque esta regulación parece ser específica de determinados tipos celulares (principalmente hipofisarios). En tumores hipofisarios, se han demostrado concentraciones elevadas de receptores de estrógenos, lo que indica actividad tumorigénica mediada por el aumento de PTTG, por lo que se lo considera una posible diana terapéutica con el empleo de fármacos antiestrogénicos<sup>20-22</sup>.

La expresión de PTTG también se ha correlacionado con la insulina y el factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF1) en líneas celulares de cáncer de mama y astrocitomas. Se han identificado dos secuencias en el promotor de PTTG que responden a la insulina y al IGF1, lo que explicaría una de las posibles vías de regulación<sup>3,23-25</sup>.

Estudios en diferentes cultivos celulares (astrocitomas y células adenohipofisarias) han demostrado expresión de PTTG mediada por los ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), por el propio factor de crecimiento epidérmico y por el factor alfa de crecimiento transformador (TGF $\alpha$ )<sup>26</sup>.

La vía de la betacatenina/*T cell factor* (TCF) se ha implicado en la regulación de la expresión de PTTG en carcinomas escamosos del esófago<sup>27</sup>, así como en la tumorigénesis hipofisaria<sup>28</sup>. Otros factores relacionados son el calcio, el factor de crecimiento hepatocitario, la ciclosporina A y los glucocorticoides<sup>29-31</sup>.

### Fosforilación de PTTG

La fosforilación de PTTG facilita su translocación al núcleo<sup>32</sup>, lo que depende de la fase del ciclo celular en que se encuen-

tre<sup>16,33</sup>. En ella interviene la cinasa dependiente de ciclina 2 (cdk2), que puede activarse por tres vías diferentes: fosfoinositol-3 cinasa (PI3K), MAPK o la subunidad Ku70 de la DNA-PK<sup>33,34</sup>. En la actualidad se está estudiando el papel de la fosforilación en la modulación de la función de PTTG.

### Papel en la tumorigénesis

La sobreexpresión de PTTG se ha comprobado en múltiples neoplasias, como tumores hipofisarios, carcinoma de pulmón, mama, endometrio, esófago, colon, recto, tiroides, ovario y testículo, gliomas, etc.<sup>7,35</sup>.

#### Proliferación celular

El efecto de PTTG en la proliferación celular no está aclarado. Como proteína oncogénica, sería esperable un aumento de la actividad proliferativa, pero como securina debería inhibir dicha proliferación<sup>35</sup>. Ambos posibles efectos han sido demostrados tanto en estudios clínicos como *in vitro*<sup>21,36,37</sup>. Incluso se ha comprobado que la sobreexpresión relativamente baja (1,7 veces) estimula la proliferación celular, mientras que una sobreexpresión alta (6 veces) inhibe el recambio celular<sup>38</sup>. Parte del efecto en la proliferación celular está mediado por la activación del protooncogén *c-myc*<sup>39</sup>. Se ha propuesto además que el estado de fosforilación de PTTG puede estar relacionado con la modificación del efecto en la proliferación celular<sup>15</sup>. Esta doble función podría justificar que la gran mayoría de los tumores hipofisarios sean benignos.

#### Aneuploidia (e inestabilidad genética)

Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* la asociación entre la sobreexpresión de PTTG y el aumento de aneuploidia e inestabilidad genética en diversos tumores y líneas celulares<sup>36,40</sup>. Su acumulación (debido a sobreexpresión o fallo en su degradación) inhibe la progresión de las mitosis y la segregación cromosómica, lo que da lugar a aneuploidia con implicación significativa en el potencial oncogénico.

#### Invasión y angiogénesis

La sobreexpresión de PTTG parece actuar de forma autocrina/paracrina incrementando la expresión de ciertos factores de crecimiento que favorecen la angiogénesis, como el FGF-2 o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)<sup>35</sup>. Estudios *in vivo* e *in vitro* han correlacionado la sobreexpresión de PTTG con la neovascularización y la expresión de FGF-2 y VEGF-A<sup>36,41,42</sup>.

### PTTG en los tumores hipofisarios

La tabla 1 expone el número de muestras hipofisarias estudiadas y los métodos empleados para la determinación de PTTG en los 12 artículos revisados. Los estudios eran muy heterogéneos en cuanto a número de pacientes, el tipo de adenomas intervenidos y las técnicas de determinación de PTTG. Varios de ellos incluían estudios en animales<sup>48,49,51</sup> o tejidos celula-

res<sup>43,45</sup>. Cristina et al<sup>48</sup> y Wierinckx et al<sup>49</sup> incluyeron sólo prolactinomas intervenidos, mientras que en el resto de los estudios no se realizó una selección por subtipo de adenoma. Se ha estudiado un total de 659 adenomas, con la siguiente distribución según el subtipo histológico: el 22% somatotropinomas, el 15% gonadotropinomas, el 15% prolactinomas, el 5% corticotropinomas, el 3% nulos y el 1% tirotropinomas. No se dispone de datos sobre el subtipo histológico en el 39% de los tumores estudiados. La mayoría de los estudios emplean técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) para la determinación de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de PTTG. Sólo dos<sup>46,50</sup> utilizan de forma aislada técnicas de inmunohistoquímica para valorar la presencia de la proteína y únicamente McCabe et al<sup>43,44</sup> emplean el *Western blot* en su estudio.

#### Características clínicas

Ningún autor encontró relación entre la sobreexpresión de PTTG y características tales como edad, sexo o síntomas clínicos al diagnóstico<sup>44,46,51</sup>.

#### Subtipo de adenoma

Todos los trabajos referían mayor expresión de PTTG en los adenomas hipofisarios que en la hipófisis normal. En tres encontraron mayor grado de expresión en los funcionantes que en los no funcionantes<sup>41,43,51</sup>. Se ha objetivado un mayor grado de sobreexpresión en los adenomas somatotropos<sup>41,47,51</sup>. Filipella et al<sup>46</sup>, por el contrario, describieron mayor expresión de PTTG en adenomas nulos, seguidos de los gonadotropos. Sin embargo, Minematsu et al<sup>47</sup> y McCabe et al<sup>44</sup> no encontraron diferencias de expresión en los adenomas tirotropos comparados con las hipófisis normales, y proponen que estos tumores presentan una fisiopatología diferente.

#### Secreción hormonal

Hunter et al<sup>48</sup> analizaron la secreción hormonal *in vitro* y el grado de sobreexpresión de PTTG, y encontraron una correlación positiva estadísticamente significativa con la secreción de GH. Esto va a favor de los datos obtenidos previamente en cultivos celulares de células lactosomatotropas, en los que la sobreexpresión de PTTG aumentaba la secreción y expresión de ARNm de somatotropina y disminuía la de prolactina<sup>35</sup>.

#### Tamaño tumoral y la capacidad de invasión

Para Zhang et al<sup>41</sup> hubo una correlación positiva entre la invasión del seno esfenoidal en los adenomas funcionantes y la sobreexpresión de PTTG, lo que supondría un comportamiento más agresivo. Hunter et al<sup>48</sup> describieron diferencias significativas en cuanto al volumen tumoral en relación con el grado de sobreexpresión de PTTG. Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias<sup>43,45,49</sup>.

#### Proliferación celular

Filipella et al<sup>46</sup> demostraron correlación entre la concentración de PTTG y la proliferación celular (medida con Ki67),

lo que se asoció a un peor pronóstico. Por el contrario, Minematsu et al<sup>47</sup> encontraron correlación sólo en las hipófisis normales. Wierinckx et al<sup>49</sup> describieron un subtipo de adenoma, al que denominaron "atípico", en el que había sobreexpresión de PTTG nuclear junto con aumento de Ki67 y p53.

### Angiogénesis

Los resultados de McCabe et al<sup>43</sup> mostraron una asociación entre PTTG y VEGF (y su receptor KDR), también descrita por Minematsu et al<sup>47</sup>, en adenomas somatotropos en relación con el número de vasos (estudiados mediante inmunohistoquímica con CD34). Sin embargo, Hunter et al<sup>45</sup> no encontraron correlación.

### Pronóstico

Filipella et al<sup>46</sup> estudiaron a 27 pacientes con seguimiento mayor de 1 año (máximo, 72 meses), y encontraron que los adenomas con mayor sobreexpresión de PTTG y altas concentraciones de Ki67 presentaban un menor tiempo de recidiva. Establecieron como punto de corte para distinguir grupos de riesgo PTTG y Ki67 del 3,3% (sensibilidad, 60%; especificidad, 76%), aunque el mejor marcador pronóstico fue la Ki67 > 2,9%. Por otra parte, Wierinckx et al<sup>49</sup> estudiaron a 25 pacientes con prolactinomas con seguimiento superior a 1 año (media, 93 meses), dividiendo los adenomas en tres subtipos en función de su agresividad. Describieron el "adenoma atípico" caracterizado por mayor porcentaje de recidivas (y más precoces), correlacionadas con la sobreexpresión de PTTG nuclear, mayor índice de Ki67 y sobreexpresión de p53.

### Respuesta a tratamiento médico

Los estudios en adenomas lactotropos no demostraron asociación entre PTTG y la resistencia al tratamiento con agonistas dopaminérgicos<sup>48,50</sup>. No existen estudios en otros tipos histológicos que analicen la respuesta al tratamiento médico.

### Conclusiones

Según los datos expuestos (tabla 2), se puede concluir que hay sobreexpresión de PTTG en los adenomas hipofisarios. La mayoría de los estudios encuentran mayor expresión de PTTG en los adenomas funcionantes y, de éstos, en los adenomas somatotropos. Con los datos disponibles hasta el momento, no hay asociación clara con el tamaño al diagnóstico o la capacidad de invasión, pero parece que hay correlación positiva entre PTTG y la proliferación tumoral (medida con Ki67). Sin embargo, hay controversia sobre la relación entre PTTG y la sobreexpresión de VEGF como marcador de angiogénesis. En cuanto a la relevancia clínica de PTTG, los datos indican una asociación con el desarrollo de recidivas y un peor pronóstico. Por todo lo referido, se necesitan más estudios para conocer la posible utilidad de la determinación del PTTG como factor pronóstico y/o diana terapéutica en los adenomas hipofisarios.

**Tabla 2** Resumen de los estudios realizados con adenomas hipofisarios humanos

<b>Tamaño tumoral e invasión</b>	
Zhang et al <sup>41</sup>	Marcador de invasión en adenomas funcionantes
McCabe et al <sup>44</sup>	Sin diferencias en grado tumoral
Hunter et al <sup>45</sup>	Relación positiva con tamaño tumoral
Filipella et al <sup>46</sup>	Sin diferencias en grado tumoral y diámetro máximo
Tena Suck et al <sup>50</sup>	Sin diferencias en volumen tumoral
<b>Proliferación</b>	
Filipella et al <sup>46</sup>	Relación positiva
Minematsu et al <sup>47</sup>	Relación positiva en hipófisis normales
Wierinckx et al <sup>49</sup>	Relación positiva
<b>Angiogénesis</b>	
McCabe et al <sup>43</sup>	Relación positiva
Hunter et al <sup>45</sup>	Sin relación
Minematsu et al <sup>47</sup>	Relación positiva en adenomas somatotropos
<b>Pronóstico</b>	
Filipella et al <sup>46</sup>	Peor pronóstico, mayor riesgo de recurrencia
Wierinckx et al <sup>49</sup>	Peor pronóstico, recidiva precoz
<b>Tratamiento médico</b>	
Cristina et al <sup>48</sup>	Sin relación
Passos et al <sup>50</sup>	Sin relación

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Niveiro de Jaime M, Aranda FI, Peiro Cabrera G. Patología de los adenomas hipofisarios. *Rev Esp Patol.* 2003;36:357-72.
- Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gen (PTTG). *Mol Endocrinol.* 1997;11:433-41.
- Karkar SS. Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG). *Gene.* 1999;29:387-95.
- Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, et al. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol.* 1999;13:156-66.
- Prezant TR, Kadioglu P, Melmed S. An intronless homolog of human proto-oncogen hPTTG is expressed in human pituitary tumors: evidence for hPTTG family. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;84:1149-52.
- Chen L, Puri R, Lefkowitz R, Kakar SS. Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene.* 2000;248:41-50.
- Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd RV, Cusimano M. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15:721-43.

8. Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrour T, Pellestor F, Klein B, et al. The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Human Reprod.* 2006;21:1705-19.
9. Chien W, Pei L. A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product. *J Biol Chem.* 2000;275:19422-7.
10. Tong Y, Tan Y, Zhou C, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition. *Oncogene.* 2007;26:5596-605.
11. Zapata AG. La regulación del ciclo celular: modelos experimentales sencillos que resultan en premios Nobel. *Anal Real Acad Farm.* 2001;67:1-14.
12. Tanaka T, Fuchs J, Loidl J, Nasmyth K. Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister chromatids and resists their precocious separation. *Nat Cell Biol.* 2000;2:492-9.
13. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science.* 1999;285:418-22.
14. Tong Y, Eigler T. Transcriptional targets for pituitary tumor-transforming gene-1. *J Mol Endocrinol.* 2009 May 11 [Epub ahead of print].
15. Boelaert K, Yu R, Tannahill LA, Stratford AL, Khanim FL, Eggo MC, et al. PTTG's C-terminal PXXP motifs modulate critical cellular processes in vitro. *J Mol Endocrinol.* 2004;33:663-77.
16. Romero F, Multom MC, Ramos-Morales F, Dominguez A, Bernal JA, Pintor-Toro JA, et al. Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:1300-7.
17. Yu R, Heany AP, Lu W, Chen J, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis. *J Biol Chem.* 2000;275:36502-5.
18. Hamid T, Kakar SS. PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. *Mol Cancer.* 2004;3:18.
19. Chesnokova V, Melmed S. Pituitary tumour-transforming gene (PTTG) and pituitary senescence. *Horm Res.* 2009;71 Suppl 2:82-7.
20. Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, Singson R, Melmed S. Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nat Med.* 1999;5:1317-21.
21. Heaney AP, Fernando M, Melmed S. Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *J Clin Invest.* 2002;109:277-83.
22. Yin H, Fujimoto H, Maruyama S, Asano K. Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in estrogen-induced pituitary tumorigenesis in rats. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92:1034-40.
23. Chamaon K, Kirches E, Kanakis D, Braeuninger S, Dietzmann K, Mawrin C. Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and nonneoplastic astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:86-92.
24. Chamaon K, Kanakis D, Mawrin C, Dietzmann K, Kirches E. Transcripts of PTTG and growth factors bFGF and IGF-1 are correlated in pituitary adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2009 May 26 [Epub ahead of print].
25. Thompson AD, Kakar SS. Insulin and IGF-1 regulate the expression of the pituitary tumor transforming gene (PTTG) in breast tumor cells. *FEBS Letters.* 2005;579:3195-200.
26. Vlotides G, Cruz-Soto M, Rubinek T, Eigler T, Auernhammer CJ, Melmed S. Mechanisms for growth factor-induced pituitary tumor transforming gene-1 expression in pituitary folliculostellate TtT/GF cells. *Mol Endocrinol.* 2006;20:3321-35.
27. Zhou C, Liu S, Zhou X, Xue L, Quan L, Lu H, et al. Overexpression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG), is regulated by beta-catenin/TCF pathway in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2005;113:891-8.
28. Gueorguiev M, Grossman AB. Pituitary gland and beta-catenin signaling: from ontogeny to oncogenesis. *Pituitary.* 2009;12:245-55.
29. Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis. *Clin Med Res.* 2006;4:130-7.
30. Stoika R, Melmed S. Expression and function of pituitary tumor transforming gene for T-lymphocyte activation. *Br J Haematol.* 2002;119:1070-4.
31. Akino K, Akita S, Mizuguchi T, Takumi I, Yu R, Wang XY, et al. A novel molecular marker of pituitary tumor transforming gene involves in a rat liver regeneration. *J Surg Res.* 2005;129:142-6.
32. Pei L. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function. *J Biol Chem.* 2000;275:31191-8.
33. Ramos-Morales F, Dominguez A, Romero F, Luna A, Multon MC, Pintor-Toro JA, et al. Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. *Oncogene.* 2000;19:403-9.
34. Wang Z, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) transforming and transactivation activity. *J Biol Chem.* 2000;275:7459-61.
35. Vlotides G, Eigler T, Melmed S. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr Rev.* 2007;28:165-86.
36. Kim DS, Fong J, Read ML, McCabe CJ. The emerging role of pituitary tumour transforming gene (PTTG) in endocrine tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;15:278-1-6.
37. Abbud RA, Takumi I, Barker EM, Ren SG, Chen DY, Wawrowsky K, et al. Early multipotential pituitary focal hyperplasia in the alpha-subunit of glycoprotein hormone-driven pituitary tumour-transforming gene transgenic mice. *Mol Endocrinol.* 2005;19:1383-91.
38. Boelaert K, Tannahill LA, Bulmer JN, Kachilele S, Chan SY, Kim D, et al. A potential role for PTTG/securin in the developing human fetal brain. *FASEB J.* 2003;17:1631-9.
39. Pei L. Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene. *J Biol Chem.* 2001;276:8484-91.
40. Yu R, Lu W, Chen J, McCabe CJ, Melmed S. Overexpressed pituitary tumor-transforming gene causes aneuploidy in live human cells. *Endocrinology.* 2003;144:4991-8.
41. Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:761-7.
42. Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA, Melmed S. Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:867-74.
43. McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4238-44.
44. McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, et al. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;58:141-50.
45. Hunter JA, Skelly RH, Aylwin SJ, Geddes JF, Evanson J, Besser GM, et al. The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol.* 2003;148:203-11.
46. Filippella M, Galland F, Kujas M, Young J, Faggiano A, Lombardi G, et al. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status

- of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;65:536-43.
47. Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol*. 2006;17:143-53.
48. Cristina C, Díaz-Torga GS, Goya RG, Kakar SS, Perez-Millán MI, Passos VQ, et al. PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropes. *Mol Cancer*. 2007;6:4.
49. Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14:887-900.
50. Tena-Suck ML, Ortiz-Plata A, De la Vega HA. Phosphatase and tensin homologue and pituitary tumor-transforming gene in pituitary adenomas. Clinical-pathologic and immunohistochemical analysis. *Ann Diagn Pathol*. 2008;12:275-82.
51. Chesnokova V, Zonis S, Kovacs K, Ben-Shlomo A, Wawrowsky K, Bannykh S, et al. p21(Cip1) restrains pituitary tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:17498-503.
52. Passos VQ, Fortes MA, Giannella-Neto D, Bronstein MD. Genes differentially expressed in prolactinomas responsive and resistant to dopamine agonists. *Neuroendocrinology*. 2009;89:163-70.
53. Horwitz GA, Miklovsy I, Heaney AP, Ren SG, Melmed S. Human pituitary tumor-transforming gene (PTTG1) motif suppresses prolactin expression. *Mol Endocrinol*. 2003;17:600-9.







ORIGINAL ARTICLE

## Pituitary tumor transforming gene and insulin-like growth factor 1 receptor expression and immunohistochemical measurement of Ki-67 as potential prognostic markers of pituitary tumors aggressiveness

Laura Sánchez-Tejada<sup>a,1</sup>, Ruth Sánchez-Ortiga<sup>a,1</sup>, Óscar Moreno-Pérez<sup>a</sup>, Carmen Fajardo Montañana<sup>b</sup>, Maria Niveiro<sup>c</sup>, Nicholas A. Tritos<sup>d</sup>, Antonio M. Picó Alfonso<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Endocrinology Department, Research Unit, Hospital General Universitario Alicante, Alicante, Spain

<sup>b</sup> Endocrinology Department, Hospital Universitario La Ribera, Spain

<sup>c</sup> Department of Pathology, Hospital General Universitario Alicante, Alicante, Spain

<sup>d</sup> Neuroendocrin Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, United States

Received 24 June 2012; accepted 28 September 2012  
Available online 15 February 2013

### KEYWORDS

Pituitary adenoma;  
Pituitary tumor  
transforming gene  
protein;  
Humans;  
Ki-67 antigen;  
Insulin-like growth  
factor 1 receptor

### Abstract

**Introduction and objective:** The ability to predict recurrence of pituitary adenoma (PA) after surgery may be helpful to determine follow-up frequency and the need for adjuvant treatment. The purpose of this study was to assess the prognostic capacity of pituitary tumor transforming gene (PTTG), Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), and Ki-67.

**Materials and methods:** In this retrospective study, the normalized copy number (NCN) of PTTG and IGF1R mRNA was measured using RT-PCR, and the Ki-67 Index was measured by immunohistochemistry in 46 PA samples. Clinical data, histological subtype, and radiographic characteristics were collected to assess associations between variables and tumor behavior. Progression of tumor remnants and its association to markers was also studied in 14 patients with no adjuvant treatment after surgery followed up for 46 ± 36 months.

**Abbreviations:** PA, pituitary adenomas; PTTG, pituitary tumor transforming gene; IGF1R, insulin-like growth factor 1 receptor; RT-PCR, real time polymerase chain reaction; PI3K/Akt, phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MRI, magnetic resonance imaging; FFPE, formalin-fixes and paraffin-embedded; FPA, functioning pituitary adenoma; NFPA, non-functioning pituitary adenoma; PRL, prolactin; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; GH, growth hormone; TSH, Thyroid stimulating hormone; DA, dopamine agonist; SSa, somatostatin analogs; ROC, receiver operating characteristics; LT, lactotrophic adenomas; CT, corticotrophic adenomas; TT, Thyrotrophic adenomas; ST, somatotrophic adenomas; GT, gonadotrophic adenomas; NC, null-cell adenomas.

\* Corresponding author.

E-mail address: antonio.pico@umh.es (A.M.P. Alfonso).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

**PALABRAS CLAVE**

Adenoma hipofisario;  
Proteína del gen  
transformador de  
tumores hipofisarios;  
Humanos;  
Antígeno Ki-67;  
Receptor del factor  
de crecimiento  
insulinoide 1

**Results:** Extrasellar tumors had a lower PTTG expression as compared to sellar tumors (0.065 [1st–3rd quartile: 0.000–0.089] NCN vs. 0.135 [0.105–0.159] NCN,  $p=0.04$ ). IGF1R expression changed depending on histological subtype ( $p=0.014$ ), and was greater in tumor with remnant growth greater than 20% during follow-up ( $10.69 \pm 3.84$  NCN vs.  $5.44 \pm 3.55$  NCN,  $p=0.014$ ).

**Conclusions:** Our results suggest that the IGF1R is a more helpful molecular marker than PTTG in PA management. Ki-67 showed no association to tumor behavior. However, the potential of these markers should be established in future studies with standardized methods and on larger samples.

© 2012 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

### Expresión del gen transformador de tumores hipofisarios y del receptor del factor de crecimiento insulinoide 1 y determinación inmunohistoquímica de Ki-67 como posibles marcadores pronósticos de la agresividad de los tumores hipofisarios

**Resumen**

**Introducción y objetivo:** La capacidad de predecir recurrencia en los adenomas hipofisarios (AH) tras la cirugía puede ser útil para determinar la frecuencia de seguimiento y la necesidad de tratamientos adyuvantes. El objetivo del presente estudio fue valorar la capacidad pronóstica de gen transformador de tumores hipofisarios (*pituitary tumor transforming gene* [PTTG]), del receptor del factor de crecimiento insulinoide 1 (*insulin-like growth factor 1 receptor* [IGF1R]) y de Ki-67.

**Material y métodos:** En este estudio retrospectivo determinamos el número de copias normalizadas de ARNm (Cnn) de PTTG e IGF1R mediante RT-PCR y el índice Ki-67 mediante inmunohistoquímica en 46 muestras de AH. Los datos clínicos, el subtipo histológico y las características radiológicas se recogieron para determinar asociaciones entre las variables y el comportamiento tumoral. Además, estudiamos la progresión de los restos tumorales y su asociación con los marcadores en 14 pacientes sin tratamiento adyuvante posquirúrgico seguidos durante  $46 \pm 36$  meses.

**Resultados:** Los tumores extraselares mostraron una expresión de PTTG menor que los intraselares (0,065 [1.º-3.º cuartil: 0,000-0,089] Cnn frente a 0,135 [0,105-0,159] Cnn,  $p=0,04$ ). La expresión de IGF1R varió en función del subtipo histológico ( $p=0,014$ ), siendo mayor en los tumores que presentaron crecimiento de los restos mayor del 20% durante el seguimiento ( $10,69 \pm 3,84$  Cnn frente a  $5,44 \pm 3,55$  Cnn,  $p=0,014$ ).

**Conclusiones:** Nuestros resultados indican que IGF1R, en mayor medida que PTTG, es un marcador molecular útil en el manejo de los AH. Ki-67 no mostró asociación con el comportamiento tumoral. Sin embargo, el potencial de estos marcadores debe ser establecido en futuros estudios con una metodología estandarizada y una muestra mayor.

© 2012 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

**Introduction**

Pituitary adenomas (PA) constitute 10–25% of intracranial neoplasms. They are almost always benign, but some show aggressive behavior with local invasion and recurrences. Several sporadic mutations of oncogenes and tumor-suppressor genes have been found in PA, but none has been found to be a reliable marker of poor outcome.<sup>1,2</sup> In clinical practice, Ki-67 antigen expression is frequently used as a prognostic indicator because it has been associated with proliferative potential and invasiveness of several human malignancies, but it has shown discordant results in pituitary adenomas.<sup>3,4</sup>

Thus, there is an increasing interest in finding specific prognostic markers. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) encodes a protein that functions like securin and transcription factor.<sup>5,6</sup> It is involved in the cell cycle regulation and may induce cellular proliferation and aneuploidy.<sup>6,7</sup> Overexpression of PTTG has been described in several neoplasms including PA.<sup>8–10</sup>

IGF1R is a tyrosine kinase receptor responsible for mediating IGF-I signaling, which plays a critical role in normal growth and has been associated with the early stages of tumor establishment. IGF1R stimulates the PI3K/Akt and MAPK pathways,<sup>11</sup> resulting in cell proliferation and apoptosis alteration. Its overexpression has been documented in many human malignancies<sup>12</sup> but it is not yet well studied in PA.

The aim of this study is to examine whether PTTG and IGF1R expression or Ki-67 index may have prognostic implications on pituitary adenomas.

**Materials and methods****Subjects**

This is a retrospective study performed at Hospital General Universitario de Alicante including patients who underwent



**Table 1** Patient characteristics.

Age (mean $\pm$ SD)	53 $\pm$ 15 years
Men (n (%))	25 (54%)
Largest diameter (mean $\pm$ SD)	30 $\pm$ 16 mm
<b>Histological classification (n (%))</b>	
Gonadotrophic adenomas	27 (58.7%)
Somatotrophic	10 (21.7%)
Corticotrophic	4 (8.7%)
Lactotrophic	3 (6.5%)
Thyrotrophic	1 (2.2%)
Null-cell adenoma	1 (2.2%)
<b>Functioning status (n (%))</b>	
Functioning pituitary tumor	13 (28.3%)
Non-functioning pituitary tumor	33 (71.7%)
<b>Extension according to Hardy's classification (n (%))</b>	
Grades I–II	4 (8.9%)
Grades III–IV	41 (91.9%)
<b>Pre-operative therapies (n)</b>	
Dopamine agonist	3
Somatostatin analogs	5

surgery for PA between 1995 and 2008. We included cases that had complete hormonal tests and magnetic resonance imaging (MRI) upon diagnosis. Minimum follow-up needed was 3 months after surgery, with the exceptions of patients who died prior to this (2 patients died of post-operative complications and one due to cardiac arrest). Clinical data were retrieved from medical files. Tumor tissue samples were obtained from the formalin-fixed and paraffin-embedded remaining fragments of pathological diagnosis. Overall, 46 patients were included in the study. This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital General Universitario de Alicante.

Histological classification was performed according to WHO 2004 classification criteria (Table 1). We also assessed functional status, considering functioning pituitary tumors (FPA), those associated with hypersecretion of prolactin, ACTH, GH, TSH and specific hormone-related syndrome. Lack of a hormone related syndrome, whether associated with biologically inactive hypersecretion or not, was defined as a non-functioning pituitary adenoma (NFPA). Invasiveness was defined as optic chiasm compression or invasion of surrounding structures like cavernous or sphenoidal sinus. Other baseline characteristics are summarized in Table 1.

As this is a retrospective study, we considered patient follow-up to be the time between surgery and the last visit to the Endocrinology Unit. Following surgery, fourteen patients received adjuvant therapies: DA (1), SSa (9) or ketoconazole (2). Thirteen patients received radiotherapy and 12 underwent a second surgery during the follow-up period due to incomplete resection after first surgery (only one of the tumor remnants experienced significant growth before radiotherapy). Then, we studied the progression of PA after surgery in patients who did not receive early postoperative treatment. Fourteen patients, with a 46  $\pm$  36 (mean  $\pm$  SD) months of follow-up, were included in this analysis. Aggressiveness was defined as the growth of tumor remnants greater than 20% in any of the tumor diameters measured.

We reviewed all the MRI scans performed during the follow-up period in order to establish the time of progression.

#### Immunohistochemical study: Ki-67 index

Immunohistochemical study was performed as previously described.<sup>13</sup> The number of positive cells defines the Ki-67 index. We applied a Ki-67 index cut-off values of 3% associated with high proliferative activity.

#### RNA source, total RNA extraction and reverse transcription

We used 2 cylindrical cores (0.6 mm-thick) from pre-selected tumor areas of FFPE tissues, to extract and isolate total RNA by using RNeasy FFPE Kit (Qiagen) according to the protocol and working under manufacturer-recommended conditions. We assessed the quality and quantity of RNA extracted from this using the NanoDrop. Reverse transcription of 2  $\mu$ g of RNA was performed in 20  $\mu$ L reaction volumes with random hexamer primers, with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used.

#### Real time Q-PCR

To select the control genes, we analyzed the expression of 32 housekeeping genes in three pools consisting of 10 sample mixes each, on a commercial endogenous plate based on TaqMan assay technologies (Applied Biosystems). The results, when analyzed with GeNorm software, showed that the most stable genes were GAPDH and YWHAZ.

To analyze the gene expression of PTTG and IGF1R genes, we chose the TaqMan Assays for each gene under manufacturer-recommended conditions. We constructed standard curves that were used to check that the amplification efficiency of the housekeeping genes selected and the target genes were similar (with a difference less than 10%) and estimated the number of copies of mRNA. Specific primers were designed to amplify the cDNA fragments detected by each TaqMan assay with Primer-BLAST. The primers chosen were subject to the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) database, which searches to find any similarities in sequence. We used commercial brain total RNA (Ambion®) as a template, which was transcribed together with adenoma samples. PCR amplification was performed in a 25  $\mu$ L reaction volume containing 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M of each primer, 1 unit of KAPA2G Robust HotStar Taq polymerase (KAPABiosystems®) and 25 ng of cDNA. PCR reactions were amplified for 35 cycles with an annealing temperature of 55  $^{\circ}\text{C}$ . The amplified fragments were purified by Qiaquick Purification Kit (Qiagen®). We confirmed the specificity of the primers and obtained the concentration of the amplified fragments using the 2100 Bioanalyzer (Agilent®). Dilutions were made for standards such as 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup>, 10<sup>12</sup>, 10<sup>13</sup> and 10<sup>14</sup> copies of mRNA, calculated from the total ng of the PCR product (according to the formula MW = [number of nucleotides  $\times$  607.4] + 157.9). Real-time PCRs of serial dilutions were performed in triplicate in 12.5  $\mu$ L reaction volumes containing 6.25  $\mu$ L of TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems®),

0.625  $\mu$ L of TaqMan Gene Expression Assay, and 2.5  $\mu$ L of template in 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) and were analyzed using SDS software (Applied Biosystems®). The R2 values for all standard curves generated were higher than 0.99 and all the efficiencies of the TaqMan assays were higher than 90%. We made an RT-minus control using Total Human DNA (Roche) to ensure that the TaqMan assays did not detect amplification of genomic DNA.

Analysis of the samples was performed in accordance with the same protocol. We included two dilutions of standard curves and no template control (NTC) on all QPCR plates to ensure that efficiencies were maintained and that they were free from contamination. All analyses were performed in duplicate. The results from each plate were only validated when the NTC was undetectable and the dCt maintained a standard deviation below 0.33 between duplicates and between both dilutions of standard curves and their initial results.

Since both housekeeping genes were highly correlated (Spearman rank correlation coefficient:  $r=0.82$ ;  $p<0.000$ ), all the results were normalized to YWHAZ. We used standard curves to estimate the copy number normalized (Cnn) of PTTG and IGF1R.

### Statistical analyses

Data were tested for statistical significance using SPSS 11.0 software (SAS Institute®). Associations between the molecular assays and the clinical-pathological features were calculated. IGF1R showed a normal distribution, whereas the rest of molecular and IHC variables showed a non-normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test). The Student's *t*-test and the Mann Whitney *U*-test were used for comparison between two groups of parametric and nonparametric data, respectively. The Chi-square test followed by Fisher's exact test, where appropriate, was used to identify correlations between categorical parameters. The Kruskal–Wallis test was used for comparison of more than two categories of non-parametric data. Receiver operating characteristics (ROC) curves were used to establish the optimal PTTG and IGF1R cut-offs for distinguishing between invasive and/or aggressive pituitary adenomas. Kaplan–Meier survival analysis and the log-rank test were used to compare progression-free interval curves. The effect of a variable was estimated by the odds ratio (OR) of the model and a 95% confidence interval (95% CI) was calculated for each OR. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation (normal distribution) or median and quartiles (non-normal distribution). *p* values  $<0.05$  were considered statistically significant.

### Results

We investigated a series of 46 patients with pituitary adenomas. Tumors were classified according to WHO 2004. Table 1 summarizes the clinical-pathological features.

#### Expression of IGF1R mRNA, PTTG mRNA and Ki-67 index on histological subtypes of PA

IGF1R expression differed between histological subtypes ( $p=0.014$ ) and had its greatest expression in NC, followed by GT. There were no statistically significant differences in

PTTG mRNA expression or Ki-67 index between different histological subtypes, although the Ki-67 index was higher in LT. We did not find significant difference in the expression of molecular variables between FPA and NFPA, although there was a trend toward more IGF1R expression in the NFPA subgroup ( $5.82 \pm 6.43$  Cnn vs.  $9.85 \pm 6.91$  Cnn,  $p=0.077$ ) (Fig. 1).

### Radiologic findings

Patients with extrasellar extension showed lower PTTG mRNA expression ( $0.065$  [ $P_{25}$ – $P_{75}$ :  $0.000$ – $0.089$ ] Cnn vs.  $0.135$  [ $0.105$ – $0.159$ ] Cnn,  $p=0.04$ ) (Fig. 2). ROC analysis identified a significant cut-off point for PTTG predicting extrasellar extension (Fig. 3a). A cut-off of 0.129 PTTG mRNA Cnn or less predicted extrasellar extension with a sensitivity of 75% and specificity of 85%. Cases with less than 0.129 Cnn of PTTG mRNA had 17.5-fold risk of extrasellar extension (95% CI, 1.6–197.4,  $p=0.02$ ). There were no statistically significant differences in clinical variables (age, sex, tumor size, histological classification, functioning status, extension according to Hardy's classification or pre-operative therapies), IGF1R mRNA expression or the Ki-67 index (Fig. 2).

### Association with growth

We studied the tumoral behavior of 14 patients who did not receive adjuvant postoperative therapies (Table 2). During follow-up period, 7 tumors grew more than 20% on at least one of the diameters measured. The average time free of progression was  $26 \pm 15$  months. All tumors had extrasellar extension at diagnosis.

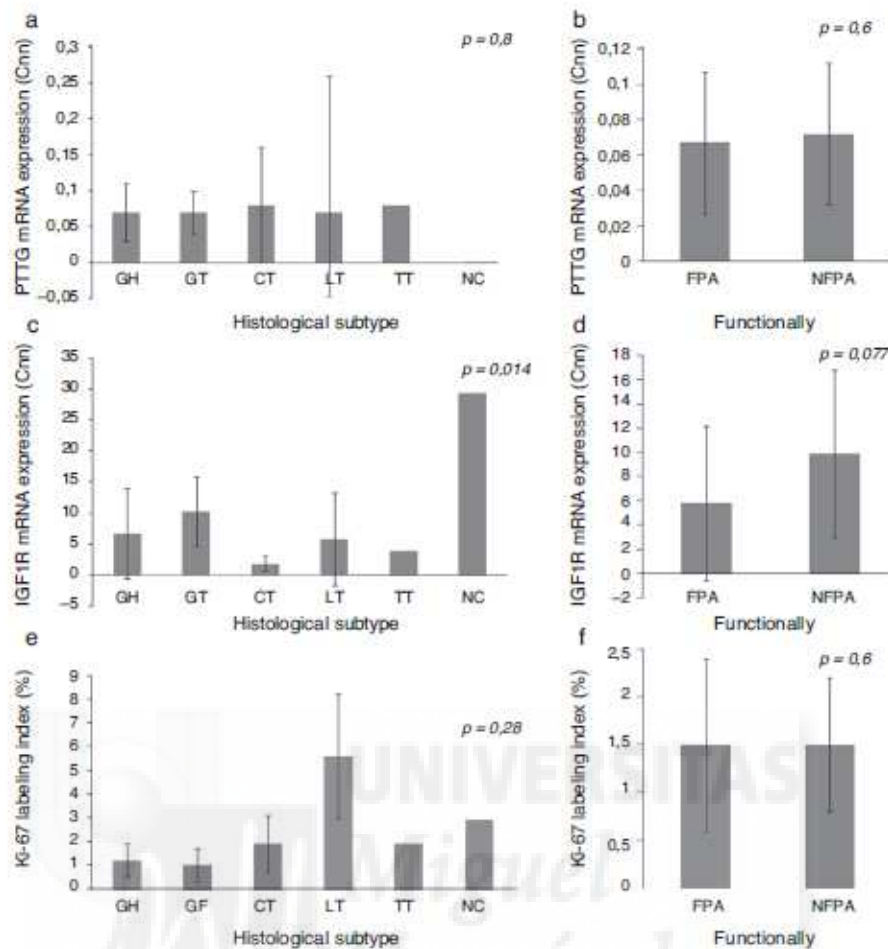
Only IGF1R mRNA Cnn showed an association with progression ( $10.69 \pm 3.84$  Cnn vs.  $5.44 \pm 3.55$  Cnn,  $p=0.014$ ) (Fig. 4). Patients with more than 4.61 Cnn of IGF1R (25th percentile) had 2.3 (95% CI 0.99–5.49,  $p=0.07$ ) times more risk of regrowth during the follow-up period. Through ROC curve analysis, this cut-off had a sensitivity of 100% and specificity of 75% ( $p=0.010$ ) (Fig. 3b). However, PTTG and Ki-67 index were not associated with tumor progression. Similarly, neither age nor sex showed association with progression.

On survival analysis, although without statistical significance, tumors without PTTG expression or with IGF1R expression less than 9 Cnn (50th percentile) had more time free of progression ( $32.3 \pm 10.3$  vs.  $24.3 \pm 7.36$  months,  $p>0.05$ ; and  $37.0 \pm 0$  vs.  $24.0 \pm 7.6$  months,  $p>0.05$ , respectively).

### Discussion

Some PAs demonstrate aggressive behavior, which leads to invasiveness of adjacent local structures, or have early regrowth (recurrence) following surgery. Thus, it is very important to identify the tumors that will become aggressive early on, in order to intensify the follow-up or to consider adjuvant therapies.

Nowadays, the pathological index most used to predict the aggressive behavior of PAs has been the Ki-67 index. However, it is a semi-quantitative measurement that is



**Figure 1** Pituitary tumor transforming gene (PTTG) and Insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) Cnn expression and Ki-67 Index (%) according to histological subtypes (a, c, e) and functional status (b, d, f). Data reported as mean  $\pm$  S.E.M. Non-parametric Kuskal-Wallis and U-Mann Whitney tests were used with  $p$  values of 0.05 or less being considered significant. Abbreviations: GH, somatotrophic adenomas; GT, gonadotrophic adenomas; CT, corticotrophic adenomas; LT, lactotrophic adenomas; TT, Thyrotrophic adenomas; NC, null-cell adenomas; FPA, functioning pituitary adenoma; NFPA, non-functioning pituitary adenoma; Cnn, copy number normalized.

highly dependent on the observer and the prognostic capability of Ki-67 index in PA has been less predictive than in others tumors.<sup>4</sup>

In our series, we did not find any difference in Ki-67 index between invasive and non-invasive tumors. Nevertheless, higher Ki-67 index was found in LT than in other histological subtypes (5.6% [3.6–7.8]) and the three LT were classified as invasive. Several authors have demonstrated that Ki-67 index is significantly higher in FPA than in NFPA.<sup>4</sup> When we analyzed LT, CT, TT and ST together vs. GT and the one NC in our series, we did not find any significant differences. This discrepancy could be attributed to the fact that 5/10 ST in our series had been treated previously with SSa and one of the three LT had received dopamine agonist. It has been suggested that preoperative treatment of ST and LT adenomas may decrease Ki-67 levels, resulting in values similar

to those of NFPA.<sup>14</sup> In any case, several studies have failed to show a significant difference among adenomas of varying hormonal subtypes or functional status.<sup>4</sup>

Different criteria used to define extension or invasiveness could explain the controversy on literature regarding the relationship between the invasiveness and Ki-67 index levels. Some authors consider invasion to be when there is histological evidence of dural invasion; but others, as us, base it on the radiologic findings on preoperative MRI. The discrepancy was greater when the invasion assessment was based on MRI imaging criteria. As an example, Wolfsberger et al.<sup>15</sup> found a correlation between Ki-67 index and radiographic extension (1.9% in invasive adenomas vs. 1.7% in non-invasive adenomas) in adenomas 3 cm or less in diameter only. We did not find any significant difference in Ki-67 levels between invasive vs. non-invasive tumors (1.2

**Table 2** Clinical characteristics of patients without adjuvant therapies.

No.	Age/sex	Histological subtype	Tumor size (mm)	Tumoral rest	Follow up (months)	Progression free time post surgery (months)	Ki-67 Index (%)	PTTG (Cnn)	IGF1R (Cnn)
1	34/f	GT	15	Yes	60	11	1.0	0.042	13.071
2	70/f	GT	22	Yes	30	12	0.5	0.086	10.948
3	71/m	GT	20	Yes	36	21	2.2	0	17.257
4	67/f	GT	20	Yes	108	23	1.2	0	9.247
5	64/m	GT	32	Yes	48	37	1.0	0.101	5.049
6	67/m	GT	30	Yes	52	37	2.3	0.176	8.302
7	70/m	GT	50	Yes	88	53	2.3	0	10.979
8	43/m	GT	43	Yes	114	-	0.8	0.038	7.857
9	72/m	GT	28	Yes	3	-	2.0	0	3.087
10	50/f	LT	45	Yes	67	-	1.5	0	1.362
11	72/f	GT	15	Yes	20	-	4.5	0.152	10.266
12	67/f	GT	50	Yes	39	-	1.2	0.097	9.019
13	36/f	ST	42	No	24	-	1.2	0.064	2.298
14	63/f	GT	46	Yes	6	-	1.5	0.089	4.164

m, male; f, female.

vs. 1.8), and we were unable to find a cut-off for Ki-67 index to predict the aggressive behavior of PAs that showed recurrence. Thus, we agree with Wolfsberger et al.<sup>13</sup> having emphasized the limitation of relying solely on Ki-67 to predict tumor behavior. Moreover, only some studies demonstrated a correlation between Ki-67 and recurrence. These discrepancies may be attributable in part to variations in the definition of recurrence and the duration of follow-up. In our case, we considered aggressiveness as growth of primary tumor remnants and this situation has been found to be correlated to recurrence.<sup>15</sup> With respect to follow up, we did not find a significant correlation between Ki-67 index and recurrence after  $46 \pm 36$  months, similar to the findings of Scheithauer and Dubois that had follow-up over 9 years.<sup>17</sup> Thus, it appears that Ki-67 alone is a poor predictor of tumor recurrence, which demonstrates the need to search for new markers of tumor behavior.

Many investigators have searched for other biological markers that could help with decision making. In recent years, IGF1R overexpression has been described in many types of cancer.<sup>11,12</sup> However, the data on IGF1R in pituitary tumor pathology almost all come exclusively from animal pituitaries or established cell line derived from the pituitary and only a few authors have investigated this gene in human PA.

Otsuka et al.<sup>18</sup> analyzed the mRNA expression of IGF1R, IGF-I, IGF-II and other growth factors in six LT, six ST and ten GT adenomas. They found lower IGF1R and IGF-I expression in ST than in LT and GT. In 2003, Kola et al.<sup>19</sup> studied a series of 18 ST and other PAs and found that IGF1R mRNA levels were significantly lower in ST and tended to be lower in CT than in normal pituitary tissue. In our series, we also found different gene expression among histological subtypes, with the greatest expression in the null-cell PA, followed by GT, and the lowest expression in CT (Fig. 1), similar to the Otsuka et al. report.<sup>18</sup> To date, no author has studied the relationship between IGF1R expression and the clinical behavior of PA, although it has become

apparent that it is associated with adverse prognosis in some type of tumors.<sup>20</sup> IGF1R overexpression has been associated with protecting cancer cells and giving the tumor capabilities such as anchorage-independent growth and surviving the process of detachment required for metastasis.<sup>21,22</sup>

In our series, we did not find a relationship between IGF1R overexpression and the invasiveness of PA, possibly due to our arbitrary definition of invasion. However, we found a positive association between expression of the IGF1R gene and aggressiveness of the PA. In fact, IGF1R expression greater than 4.61 Cnn may distinguish tumors with significant growth during follow up with a sensitivity of 100% and specificity of 75%.

There are no references in literature with which to compare our results; however, they are consistent with studies carried out on the molecular biology of PAs. Thus, loss of E-cadherin expression or function and its nuclear translocation are well recognized as causing cell detachment and have been linked to pituitary tumor invasion.<sup>23</sup> The IGF1R pathway activation can result in the disruption of  $\beta$ -catenin/E-cadherin complexes, favoring the relocation of IRS-1/ $\beta$ -catenin complexes to the nucleus to enhance  $\beta$ -catenin transcriptional activity<sup>24</sup>. Similarly, tumor cell motility and invasive potential are influenced by IGF-induced secretion of metalloproteinase, enzymes that can degrade and reorganize the extracellular matrix (ECM) and whose overexpression is usually associated with tumor invasion and metastasis.<sup>25</sup> Therefore, our results are consistent with the hypothesis that IGF1R expression can be related to the outcome of PA.

Another protein widely studied in regard to its relationship with tumorigenesis is PTTG. All studies that analyze normal pituitary tissue find higher PTTG expression in pituitary adenomas than in normal tissue. However, data from literature show a high discrepancy between the results of different studies of PTTG expression as marker of invasive and aggressive behavior of PA.<sup>10</sup> Table 3 shows the conflicting views existing among different authors regarding the

**Table 3** Description of studies on relationship between pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression and pituitary adenoma behavior.

Author	Sample	Method	Results
Zhang et al. (1999) <sup>28</sup>	54 PA and normal pituitary tissue	RT-PCR	Higher levels of PTTG than normal pituitary tissues: 23/30 NPA, 9/10 LT, 13/13 ST, 1/1 CT. Higher expression in functioning pituitary adenomas with invasion of sinus sphenoid.
McCabe et al. (2003) <sup>27</sup>	121 PA: 92 NFPA, 16 ST, 5 LT, 5 CT, 5 TT. 10 normal pituitary tissue	qPCR Western Blot	5-Fold increased PTTG expression in PA vs. normal pituitary tissue. No correlation with radiological parameters or recurrence.
Filippella et al. (2006) <sup>29</sup>	45 PA: 18 NFPA, 8 ST, 14 LT, 6 CT. Normal pituitary tissue.	qPCR	Higher expression in PA vs. normal tissue (+89% of PA samples). No correlation with radiological parameters. Higher expression in recurrent tumors.
Wierlnckx et al. (2007) <sup>28</sup>	25 LT Samples of rat LT	Immunohistochemistry	No correlation with clinical course.
Noh et al. (2009) <sup>30</sup>	35 NFPA: 26 with recurrence and 9 without	Immunohistochemistry	Association with early but no late recurrence.
Salehi et al. (2010) <sup>3</sup>	89 PA	Immunohistochemistry	ST more expression than other tumors.
Our results	46 PA	qPCR	Inverse correlation with radiological parameters or recurrence

Abbreviations: PA, pituitary adenoma; FPA, functioning pituitary tumors; NFPA, non-functioning pituitary tumors; GT, gonadotrophic adenomas; ST, somatotrophic adenoma; CT, corticotrophic adenoma; LT, prolactinoma; TT, thyrotrophic adenoma; NC, null-cell adenoma.

influence of PTTG on the behavior of a PA. Only Zhang et al.<sup>28</sup> find a correlation between its levels and the pre-operative extension of the FPA but not in NFPA.

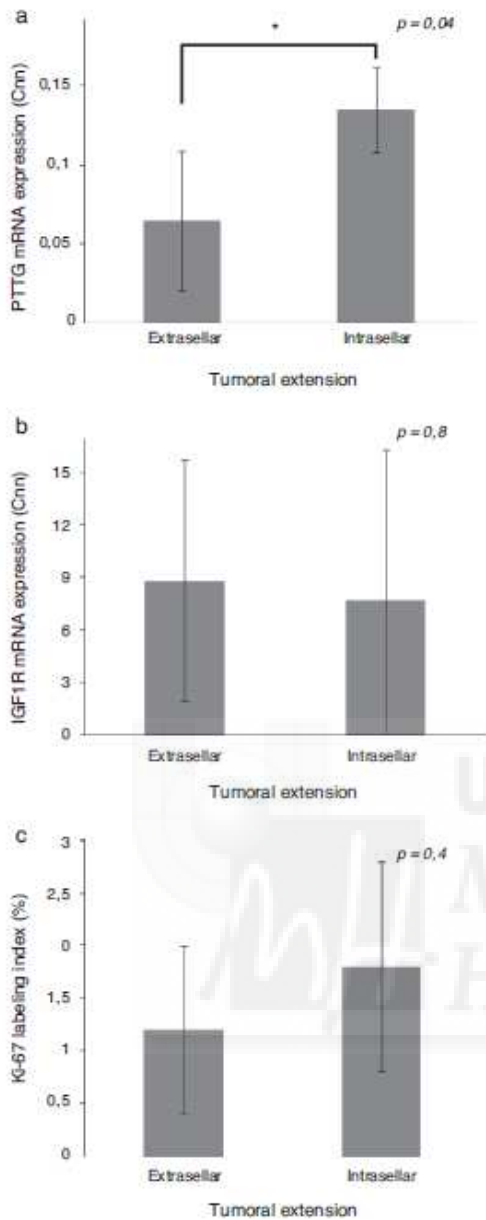
Our results show lower PTTG expression in invasive tumors than in non-invasive tumors. When we studied only clinically functional adenomas, we found significantly higher PTTG expression in intrasellar vs. extrasellar tumors; however, we considered all types of extrasellar extension of PA, whereas Zhang et al.<sup>28</sup> found higher PTTG expression only in sphenoid sinus invasion. In addition, Zhang et al.<sup>28</sup> measured PTTG using a densitometry method on electrophoresis results after Reverse Transcription PCR, a semi-quantitative technique, while we used the current gold standard, real-time PCR with TaqMan<sup>®</sup> technology, which is a more sensitive and specific quantitative technique. On the whole, given the overall methodological differences, we feel that the results are not comparable. Although our results may suggest the role of PTTG as protective in FPA, the low number of patients studied in our series influences the strength of our results. Nevertheless, PTTG has demonstrated *in vitro* and *in vivo* activity as protooncogen, inducing cell proliferation and tumor growth, as well as securin, inhibiting proliferation; so this double function could explain the lower PTTG expression, with low securin activity, found in extrasellar tumors compared with intrasellar ones.<sup>9</sup> After all, we agree with other authors<sup>27,28</sup> that PTTG cannot be considered a biological marker of invasiveness on PA.

With respect to aggressiveness, Filippella et al.<sup>29</sup> in their series found that a PTTG score of 3.3% clearly distinguished between recurrent and non-recurrent pituitary adenomas with a sensitivity of 60% and specificity of 76% (ROC curve method); and Noh et al.<sup>30</sup> found early, no later than one year

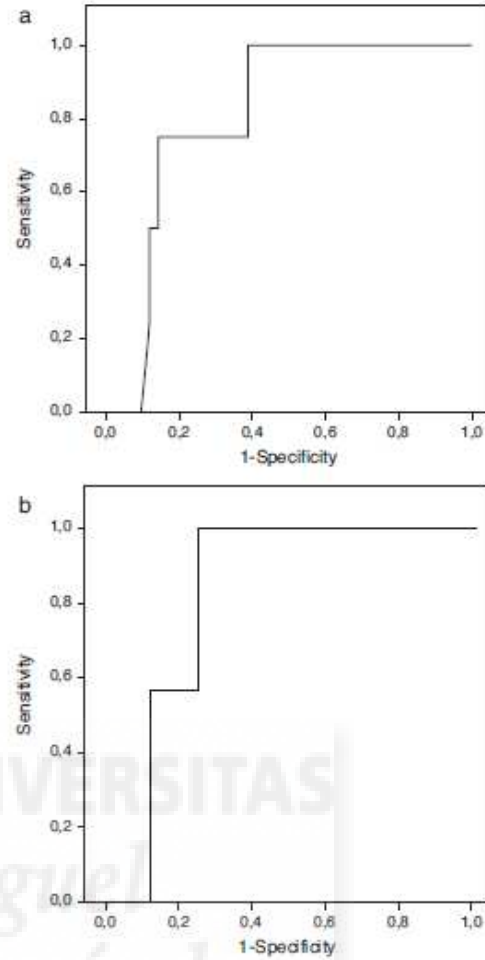
after surgery, recurrence in tumors with the highest levels of PTTG. Paradoxically, to Filippella et al.<sup>29</sup> the fact that 18/45 patients in their series had a follow-up less than 1 year could dilute the relationship between PTTG and recurrence; therefore, they analyzed the results for 27 patients with more than 1 year of follow up separately. Thus, once again, the results from literature are conflicting. Moreover, McCabe et al.<sup>27</sup> using similar technology as us, real-time PCR, in the largest published PA series, did not observe a significant association between mRNA expression and the presence of recurrent tumor growth, although the authors did not report length of the follow up.

We demonstrated progression in 7/14 patients who did not receive post-operative adjuvant treatments during the follow-up (46 ± 36 months). To minimize bias, we performed an analysis of recurrence-free survival (Kaplan Meier). On the whole, we did not find a correlation between PTTG expression and aggressiveness; however, when we separated our sample by PTTG expression, the patients without PTTG expression show a tendency to have more time free of recurrence, although not reaching statistical significance.

Our main limitation was that we studied retrospectively a small cohort which could affect the strength of our results and our sample was a very heterogeneous group of tumors (different endocrine and non-endocrine types, in some cases only one representative of an adenoma type). Moreover, you should note that a comparison of the various tumor types in FPA is difficult since some types (e.g. prolactinomas) are treated surgically only when medical treatment fails. This selects for the more aggressive tumors and could lead to a selection bias. Furthermore, it has not been possible to use the relative quantification by qPCR using ddCT method



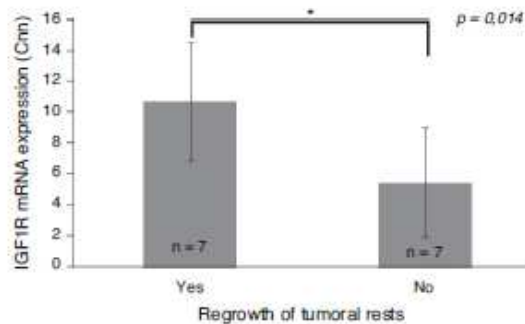
**Figure 2** Comparison of pituitary tumor transforming gene (PTTG) (a) and Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) (b) Cnn expression and Ki-67 Index (%) (c) between intrasellar and extrasellar tumors. Data reported as mean  $\pm$  S.E.M. Non-parametric U-Mann Whitney test was used with p values of 0.05 or less being considered significant. Abbreviations: Cnn, copy number normalized.



**Figure 3** ROC curves: (a) ROC analysis of intrasellar tumoral extension and pituitary tumor transforming gene (PTTG) Cnn expression. (b) ROC analysis of tumoral progression on patients without adjuvant therapies and IGF1R Cnn expression. Abbreviations: Cnn, copy number normalized.

because it was not possible to obtain normal tissue. Nevertheless, we have adapted our protocol to estimate the number of copies of the different genes' transcripts and we have only compared the behavior of these genes among different subtypes of PA or among the different variables studied.

In conclusion, we have found that IGF1R is associated with progression of tumor rests and it can be new marker in PA outcome. In regard to PTTG, our data do not suggest clearly prognostic implications in PA according with some previous studies. Further work involving large series of patients and a prospective analysis needs to be performed in order to clarify the potential prognostic role of new biomarkers in clinical practice.



**Figure 4** Differences between insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) Cnn expression according to tumoral progression during the follow-up in tumors without post-surgical treatment. Data reported as mean  $\pm$  S.E.M. Non-parametric U-Mann Whitney test was used with *p* values of 0.05 or less being considered significant. Abbreviations: Cnn, copy number normalized.

### Conflict of interest

This work was supported by Pfizer Grant.

### References

- Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, et al. Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery*. 2006;59:341–53, discussion 53.
- Vlotides G, Eigler T, Melmed S. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr Rev*. 2007;28:165–86.
- Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV, Cusimano M. Biomarkers of pituitary neoplasms: a review (part II). *Neurosurgery*. 2010;67:1790–8, discussion 8.
- Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV, Cusimano M. Ki-67 in pituitary neoplasms: a review – part I. *Neurosurgery*. 2009;65:429–37, discussion 37.
- Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*. 1999;285:418–22.
- Tong Y, Eigler T. Transcriptional targets for pituitary tumor-transforming gene-1. *J Mol Endocrinol*. 2009;43:179–85.
- Pei L. Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene. *J Biol Chem*. 2001;276:8484–91.
- Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*. 1997;11:433–41.
- Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd RV, Cusimano M. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15:721–43.
- Sanchez-Ortiga R, Sanchez Tejada L, Peiro Cabrera G, Moreno-Pérez O, Arias Mendoza N, Aranda López FI, et al. Role of pituitary tumour-transforming gene (PTTG) in the pituitary adenomas. *Endocrinol Nutr*. 2010;57:28–34.
- Hartog H, Wesseling J, Boezen HM, van der Graaf WT. The insulin-like growth factor I receptor in cancer: old focus, new future. *Eur J Cancer*. 2007;43:1895–904.
- Ouban A, Muraca P, Yeatman T, Coppola D. Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. *Hum Pathol*. 2003;34:803–8.
- Niveiro M, Aranda FI, Peiro G, Alenda C, Pico A. Immunohistochemical analysis of tumor angiogenic factors in human pituitary adenomas. *Hum Pathol*. 2005;36:1090–5.
- Jaffrain-Rea ML, Di Stefano D, Minniti G, Esposito V, Bultrini A, Ferretti E, et al. A critical reappraisal of MIB-1 labelling index significance in a large series of pituitary tumours: secreting versus non-secreting adenomas. *Endocr Relat Cancer*. 2002;9:103–13.
- Wolfsberger S, Wunderer J, Zachenhofer I, Czech T, Böcher-Schwarz HG, Hainfellner J, et al. Expression of cell proliferation markers in pituitary adenomas – correlation and clinical relevance of MIB-1 and anti-topoisomerase-IIalpha. *Acta Neurochir (Wien)*. 2004;146:831–9.
- Nakabayashi H, Sunada I, Hara M. Immunohistochemical analyses of cell cycle-related proteins, apoptosis, and proliferation in pituitary adenomas. *J Histochem Cytochem*. 2001;49:1193–4.
- Dubois S, Guyétant S, Menei P, Rodien P, Illouz F, Vielle B, et al. Relevance of Ki-67 and prognostic factors for recurrence/progression of gonadotrophic adenomas after first surgery. *Eur J Endocrinol*. 2007;157:141–7.
- Otsuka F, Tamiya T, Yamauchi T, Ogura T, Ohmoto T, Makino H. Quantitative analysis of growth-related factors in human pituitary adenomas. Lowered insulin-like growth factor-I and its receptor mRNA in growth hormone-producing adenomas. *Regul Pept*. 1999;83:31–8.
- Kola B, Korbonits M, Diaz-Cano S, Katsas G, Morris DG, Jordan S, et al. Reduced expression of the growth hormone and type 1 insulin-like growth factor receptors in human somatotroph tumours and an analysis of possible mutations of the growth hormone receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59:328–38.
- Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res*. 2008;14:6364–70.
- Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C, Rubin R, et al. A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*. 1994;14:4588–95.
- Samani AA, Brodt P. The receptor for the type I insulin-like growth factor and its ligands regulate multiple cellular functions that impact on metastasis. *Surg Oncol Clin N Am*. 2001;10:289–312, viii.
- Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, Clarkson A, Cook RJ, Little NS, et al. Nuclear accumulation of e-cadherin correlates with loss of cytoplasmic membrane staining and invasion in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:1436–42.
- Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:12103–8.
- Zhang D, Samani AA, Brodt P. The role of the IGF-I receptor in the regulation of matrix metalloproteinases, tumor invasion and metastasis. *Horm Metab Res*. 2003;35:802–8.
- Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:761–7.
- McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, Heaney AP, Tannahill LA, Hussain S, et al. Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;58:141–50.

28. Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14:887-900.
29. Filippella M, Galland F, Kujas M, Young J, Faggiano A, Lombardi G, et al. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;65:536-43.
30. Noh TW, Jeong HJ, Lee MK, Kim TS, Kim SH, Lee EJ. Predicting recurrence of nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4406-13.





# Contribution of the Molecular Biology to the Study of the Behaviour of Pituitary Adenomas

Sánchez-Tejada L<sup>1</sup>, Sánchez-Ortiga R<sup>2</sup>, Niveiro M<sup>3</sup>, Peiro G<sup>1</sup>, Moreno O<sup>2</sup>, Aranda I<sup>3</sup>, Pico Alfonso A.A.<sup>2</sup>

Hospital General Universitario Alicante 1: Research Unit and, 2: Dept. of Endocrinology, 3: Dept of Pathology

## Background:

There is an increasing interest to find specific prognostic markers of the aggressive behaviour of some pituitary adenomas (PA). The most studied markers have been the IHC staining for Ki-67 and p53. The aim of this study was to evaluate the relevance of potential prognostic markers such as growth factors (IGF1R), angiogenic factors (VEGF and his receptor) and controversial genes (PTTG) versus the IHC expression of Ki-67 and p53 in PA.

**Design:** Retrospective descriptive study.

**Patients:** Samples from 57 patients with PA (32 GT, 6 CT, 6 ST, 4 LT, 6 GLT, 1 TT and 1 null-cell).

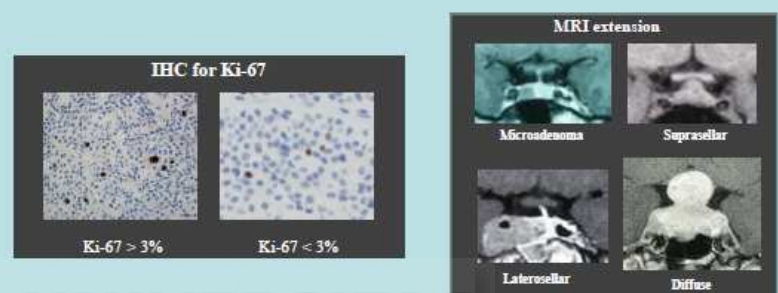
## Methods:

-mRNA expression: we used quantitative real-time PCR using Taqman technology and TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems).

-IHC staining was performed in whole sections for ER (cut-off 10%), Ki-67 and p53 (cut-off 20%).

-The PA extension in magnetic resonance imaging at diagnosis was revised in 17 patients.

-Statistical analysis: T-Student test was used with P<0.05 as the cut-off for decisions of statistical significance.

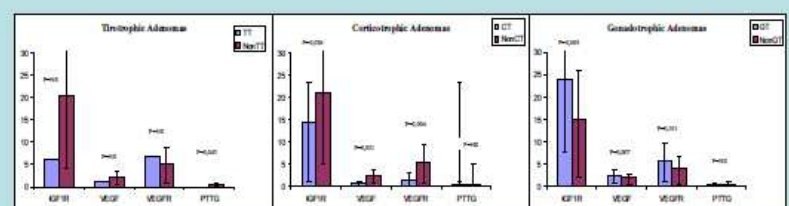


**Table 1.** Show the IHC expression of Ki-67, p53 and ER in overall samples, distributed by histologic subtypes of PA. Null-cell and TT subtypes can not be analyzed because there is only one sample per type.

OMS Classification	N	ki-67	p53	ER
GT	32	11 (9-21)	0,60 (0,25-1,00)	0,0 (0,0-17,5)
CT	6	10,5 (5,0-23,0)	0,75 (0,50-1,00)	10 (0-20)
ST	6	19,0 (11,5-20,0)	2,5 (0,5-9,5)	0,0 (0,0-17,5)
LT	4	71 (42-100)	11 (2-20)	30 (0-60)
GLT	6	0,0 (0,0-12,5)	5,0 (3,0-10,5)	0,0 (0,0-7,5)
		Not significant	Not significant	Not significant

## Results:

Overexpression of p53 was positively correlated with the level of VEGF and VEGFR expression (p=0.001 and p=0.02, respectively). The tumors with diffuse extension showed association with increased IGF1R expression (p=0.003) but there was no correlation with Ki-67, p53 or ER status.



**Figure 1.** Show the mRNA expression differences of IGF1R, VEGF, VEGFR and PTTG between histological subtypes, in TT, CT and GT tumors. The differences between the other histologic subtypes were not statistically significant.

## Conclusions:

Our preliminary results suggest that the expression levels of VEGF, VEGFR, IGF1R and PTTG behave differently depending on the histological subtype. The combination of these genes could provide more information about the behavior of the PA than the IHC of Ki-67 or p53.

**Abbreviations:**  
IGF1R: Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
PTTG: Pituitary Tumor Transforming Gene  
GT: Gonadotrophic adenoma  
CT: Corticotrophic Adenoma  
ST: Somatotrophic adenoma  
LT: Lactotrophic adenoma  
TT: Tumor  
GLT: Growth hormone releasing hormone secreting adenoma

# Molecular markers as prognostic indicator of the behavior of the Pituitary Adenomas

**P1-426** Ruth Sanchez-Ortiga, MD<sup>1</sup>; Laura Sanchez-Tejada, MD<sup>2</sup>; Oscar Moreno-Perez, MD<sup>3</sup>; Maria Niveiro, MD<sup>4</sup>; Carmen Fajardo, MD<sup>4</sup>; Pedro Riesgo, MD<sup>5</sup> and Antonio Pico, MD<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Endocrinology, <sup>2</sup>Research Unit, <sup>3</sup>Pathology/Hospital General Universitario Alicante (HGUA), Alicante, Spain. <sup>4</sup>Endocrinology, <sup>5</sup>Neurosurgery, Hospital La Ribera, Alzira, Valencia, Spain.



## Background

There is an increasing interest in finding specific prognostic markers to predict pituitary adenomas (PA) that will behave aggressively, in order to optimize follow-up and adjuvant therapies.

The most studied marker has been immunohistochemical (IHC) staining for Ki-67 with controversial findings<sup>1</sup>. However, in recent years some other markers has been evaluated, like pituitary tumor-transforming gene (PTTG) and angiogenic factors as vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor KDR<sup>2</sup>.

## Objectives

This study evaluated the prognostic capability of molecular study of:  
 - growth factors (IGF 1R),  
 - angiogenic factors (vascular endothelial growth factor [VEGF] and its receptor KDR) and  
 - proto-oncogen PTTG  
 versus the IHC expression of Ki-67 in PA.

## Methods

**Design:** Retrospective descriptive study performed at HGUA between 1995-2008.

**Subjects:** 46 human PA samples  
 27 gonadotrophic (GT)  
 10 somatotrophic (ST)  
 4 corticotrophic (CT)  
 3 lactotrophic (LT)  
 1 thyrotrophic (TT)  
 1 null-cell (NC)

Baseline characteristics	
Age	52.8 14.9 years
Men	25 (54.3%)
Maximum diameter	30±16 mm
Invasive PA	38 (80.7%)
Pre-surgical treatment	
Somatostatin analogs	5/10 ST
Dopamine agonists	1/3 LT

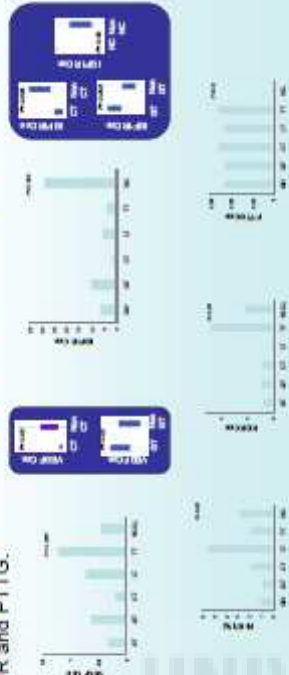
**Molecular techniques:** We evaluated mRNA expression by quantitative real-time PCR using Taqman technology and TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems). We use standard curves to estimate the copy number normalized (Cnn) of molecular markers.

**IHC study:** Immunohistochemical staining was performed in whole sections for Ki-67 labeling index.

**Statistical analysis:** U Mann-Whitney or Student t and Kruskal-Wallis or ANOVA tests were used for statistical analysis.

## Results

VEGF and IGF1R expression differs significantly between histological subtypes, but there were no statistically significant differences in the expression of Ki-67, KDR and PTTG.



Invasive tumors had more VEGF expression than non-invasive. Also invasiveness on MRI showed association with lower PTTG expression. The others markers studied weren't able to identify invasive tumors.



None of these markers were modified after treatment with SSA or DA.

## Conclusion

Molecular markers may be useful in the management of PA. However, more studies are needed to predict the specific behaviour of different subtypes of pituitary adenomas.

## References

1. Sakshi F. Agur A, Schellhaas BM, Kovacs K, Lloyd RV, Cuadras M. Ki-67 in pituitary neoplasms: a review-part I. *Neurosurgery*. 2009;65(3):426-37; discussion 37.
2. Sakshi F. Agur A, Schellhaas BM, Kovacs K, Lloyd RV, Cuadras M. Biomarkers in pituitary neoplasms: a review-part II. *Neurosurgery*. 2011;67(1):176G-86.

# Molecular classification of pituitary adenomas

Antonio M. Picó Alfonso<sup>1</sup>, Laura Sánchez-Tejada<sup>2</sup>, Ruth Sánchez-Ortiga<sup>1</sup>, Rosa Cámara<sup>3</sup>,  
Cristina Lamas<sup>4</sup>, Javier Abarca<sup>5</sup>, Irene Monjas<sup>6</sup>, Pedro Riesgo<sup>7</sup>, Carmen Fajardo<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Endocrinology Department, Hospital General Universitario Alicante, Spain. <sup>2</sup> Research Unit of Endocrinology Department, Hospital General Universitario Alicante, Spain. <sup>3</sup> Endocrinology Department H.U. La Fé de Valencia, Spain. <sup>4</sup> Endocrinology Department H.G.U. Albacete, Spain. <sup>5</sup> Neurosurgery Department, Hospital General Universitario Alicante, Spain. <sup>6</sup> Otorhinolaryngology Department, Hospital General Universitario Alicante, Spain. <sup>7</sup> Neurosurgery Department, Hospital La Ribera, Spain. <sup>8</sup> Endocrinology Department, Hospital La Ribera, Spain.

**GP-18-09**

## Purpose

The 2004 edition of the WHO text "Histological typing of endocrine tumors" classified pituitary adenomas (PA) on the basis of their histological and immunohistochemical characteristics. Recent advances on the knowledge of the molecular patterns of these tumours may allow establishing a molecular classification with higher accuracy and specificity than previous one.

## Methods

Within the pale of the multicenter Spanish Molecular Registry of Pituitary Adenomas (REMAH), a multicentre clinical-basic project, we had obtained the molecular phenotype of 172 PA. Expression levels of 26 genes were measured by qRT-PCR, including all pituitary hormones, receptors for somatostatin, dopamine, and others: growth hormone-releasing hormone receptor, gonadotropin-releasing hormone receptor, type 1 corticotropin-releasing hormone receptor, arginine vasopressin receptor 1b and type 1 ghrelin receptor, and three housekeeping genes for normalization. 9 healthy pituitary from autopsies were used as calibrator reference.

## Results

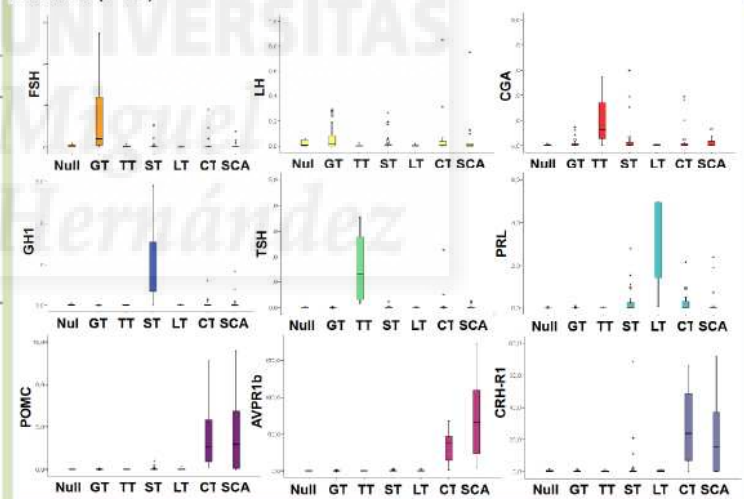
Based on the established clinical diagnosis: **Functioning PA (FPA: somatotroph, corticotroph, tirotroph and lactotroph adenomas)** and **Non-Functioning PA (NFPA: gonadotroph, silents and null cell adenomas)**, and on the immunohistochemical data, we have determined the gene expression ranges in each adenoma subtype.

FPA and NFPA presenting expression of several genes, were subclassified depending on the dominant expression (fig. 1). We established as "gold standard" the p25 expression of each gene in the complete sample of each adenoma subtype. On the basis of our results, we have been able to define the molecular classification of pituitary adenomas showed in table 1.

Table 1. Molecular classification of pituitary adenomas

Subtype PA	Dominant Expression	Clinical symptoms
<b>Corticotrophs (CT)</b>	POMC, AVPR1 and CRH-R1	Cushing's syndrome
<b>Somatotrophs (ST)</b>	Pure	Acromegaly
	Mixed	
	Plurihormonal	
<b>Lactotrophs (LT)</b>	PRL	Galactorrhea and/or hypogonadism
<b>Thyrotrophs (TT)</b>	TSH and $\alpha$ -Subunit	Hyperthyroidism
<b>Gonadotrophs (GT)</b>	FSH, LH or/and $\alpha$ -subunit	Nonfunctioning PA
	FSHomas	
	LHomas	
<b>Silent Corticotrophs (SCA)</b>	combinations of FSH, LH and $\alpha$ -Subunit	Nonfunctioning PA
<b>Silent Tirotrophs</b>	TSH	
<b>Null Cell Adenomas (Null)</b>	Without any hormone's gene expression	
<b>Multihormonal</b>	Combination of different hormones	

Figure 1. Level of expression of several pituitary genes in the different subtypes of pituitary adenomas (n=172)



Pituitary hormones (FSH: Follicle Stimulating Hormone; LH: Luteal Hormone; CGA: Gene encoding alpha subunit; POMC: Proopiomelanocortin (ACTH precursor); GH: Growth hormone), and receptors involved in the synthesis and secretion of ACTH (AVPR1b: Vasopressin Receptor 1b; CRH-R1: Corticotropin Releasing Hormone Receptor 1).

## Conclusions

Advances in the molecular knowledge of the pathogenesis of PA may allow a more specific classification of PA, with higher accuracy than the immunohistochemical one, especially in the case of NFPA, helping physicians to better identify and manage these tumors.

Nothing to Disclose: AP, RS, LS, PR, JA, IM, RC, CL, CF.  
Sources of Research Support: by NOVARTIS Grant to SEEN.

Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana



9-GP-18  
Pituitary basic and neuroendocrinology  
Antonio Picó

DOI: 10.33073/ece.17648.2015

Poster presented at: ECE2015 16-20 May 2015 Dublin, Ireland



Poster Session Online

