

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
PROGRAMA DE DOCTORADO – BIOMEDICINA

**Prognostic value of molecular study in
Cushing's disease**

**Valor pronóstico del estudio molecular en la
enfermedad de Cushing**

Paloma Moreno Moreno

Directores

María Ángeles Gálvez Moreno

**Directora UGC de
Endocrinología y Nutrición,
Hospital Univ. Reina Sofía**

Justo P. Castaño Fuentes

**Catedrático de Biología
Celular, Universidad de
Córdoba**

Raúl M. Luque Huertas

**Catedrático de Biología
Celular, Universidad de
Córdoba**

Córdoba, 15 de Mayo 2022

TITULO: *Valor pronóstico del estudio molecular en la enfermedad de Cushing*

AUTOR: *Paloma Moreno Moreno*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



TITULO DE LA TESIS: Valor pronóstico del estudio molecular en la enfermedad de Cushing.

DOCTORANDO: Paloma Moreno Moreno

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, la doctoranda Paloma Moreno Moreno ha alcanzado e incluso superado los objetivos planteados al comienzo de la misma, al tiempo que ha caracterizado clínica y molecularmente una cohorte de pacientes con la enfermedad de Cushing que ha sido de gran utilidad para el grupo de investigación, ya que le han permitido obtener resultados muy relevantes en el estudio de esta enfermedad tumoral. Concretamente, como fruto de su trabajo durante este periodo, ha publicado un trabajo directamente relacionado con su tesis doctoral, en la revista J Clin Endocrinol Metab. 2022 [doi: 10.1210/clinem/dgac172]; Cuartil 1 del área de Endocrinología y Metabolismo (35/179), factor de impacto: 5.1], cumpliendo así el criterio de calidad del programa de doctorado en Biomedicina de la Universidad de Córdoba. Por último, la doctoranda ha presentado sus resultados en diferentes congresos de ámbito nacional e internacional,

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Y para que conste, firmamos la presente en Córdoba, a 12 de Mayo de 2022

GALVEZ
MORENO
MARIA
ANGELES -
29077500A

Firmado digitalmente
por GALVEZ MORENO
MARIA ANGELES -
29077500A
Fecha: 2022.05.12
15:18:39 +02'00'

CASTAÑO
FUENTES
JUSTO PASTOR
- 30508275V

Firmado
digitalmente por
CASTAÑO FUENTES
JUSTO PASTOR -
30508275V
Fecha: 2022.05.12
17:01:31 +02'00'

LUQUE
HUERTAS
RAUL MIGUEL
- 30813254Q

Firmado
digitalmente por
LUQUE HUERTAS
RAUL MIGUEL -
30813254Q
Fecha: 2022.05.12
13:55:02 +02'00'

Fdo. M. Ángeles Gálvez Moreno

Justo P. Castaño Fuentes

Raúl M. Luque Huertas



Dña. María Ángeles Gálvez Moreno, Directora UGC de Endocrinología y Nutrición del Hospital Univ. Reina Sofía, D. Justo P. Castaño Fuentes y D. Raúl M. Luque Huertas, Catedráticos del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN

Que Dña. Paloma Moreno Moreno, Licenciada en Medicina, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “**Valor pronóstico del estudio molecular en la enfermedad de Cushing**” y que bajo nuestro juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Biomedicina.

Y para que conste, firmamos la presente en Córdoba, a 12 de Mayo de 2022

GALVEZ
MORENO
MARIA
ANGELES -
29077500A

Firmado digitalmente por GALVEZ MORENO MARIA ANGELES - 29077500A
Fecha: 2022.05.12 15:21:50 +02'00'

CASTAÑO
FUENTES
JUSTO
PASTOR -
30508275V

Firmado digitalmente por CASTAÑO FUENTES JUSTO PASTOR - 30508275V
Fecha: 2022.05.12 17:01:56 +02'00'

LUQUE
HUERTAS
RAUL
MIGUEL -
30813254Q

Firmado digitalmente por LUQUE HUERTAS RAUL MIGUEL - 30813254Q
Fecha: 2022.05.12 13:54:42 +02'00'

Fdo. M. Ángeles Gálvez Moreno Justo P. Castaño Fuentes Raúl M. Luque Huertas

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba y en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), bajo la dirección de los Dres. María Ángeles Gálvez Moreno, Justo P. Castaño Fuentes y Raúl M. Luque Huertas. Dicho trabajo fue subvencionado mediante proyectos/ayudas del MINECO (PID2019-105564RB-I00, PID2019-105201RB-I00), Junta de Andalucía (P20_00442; PEER-0048-2020, BIO-0139) y del Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn).

A mi padre, te fuiste demasiado pronto, pero siempre presente, mi referente como persona y como profesional. A mi madre, a mi hermana, a mi marido y a mis hijos, lo más importante en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En muchas ocasiones he pensado que este trabajo no llegaría a su fin, y en este momento quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que lo han hecho posible.

En primer lugar, agradecer a mis directores la Dra. María Ángeles Gálvez Moreno, el Prof. Dr. Justo Castaño y al Prof. Dr. Raúl Luque por aceptar dirigir esta Tesis Doctoral, por todo su esfuerzo y tiempo que le han dedicado. A la Dra. María Ángeles Gálvez, por su ejemplo constante, por su excelencia profesional, por su gran calidad humana, generosidad y por la confianza depositada en mí, mis palabras no son capaces de expresarle todo mi agradecimiento. Al Prof. Dr. Justo Castaño, por su disponibilidad y apoyo en este difícil camino de la investigación, por trasmitirme desde que nos conocemos la importancia de incorporar en nuestra práctica clínica la investigación translacional. Al Prof. Dr. Raúl Luque, por su excelencia académica, por empujarme a continuar y por su promesa cumplida, sin él esta tesis doctoral no hubiese concluido. Al Dr. Alejandro Ibáñez, por su ayuda y disponibilidad a lo largo de estos años, por hacerme fácil lo que parecía imposible. A la Dra. María Rosa Alhambra, por su amistad sincera y ayuda incondicional, por mostrarme que merecía la pena continuar. A la Dra. Aura D. Herrera, por su colaboración en este trabajo. A todos los compañeros y amigos de la U.G.C de Endocrinología y Nutrición, por el apoyo y cariño que me han demostrado, especial mención a la Dra. Concepción Muñoz y al Dr. Ángel Rebollo, por estar siempre que los he necesitado en este duro camino. Al Dr. Alfonso Soto, a la Dra. Carmen Fajardo, a la Dra. Rosa Cámara, a la Dra. Cristina Lama y al Dr. Antonio Picó, por su generosidad al permitirme bucear en las historias clínicas de sus pacientes y su colaboración para que este trabajo saliera hacia delante.

A mis padres, por todas las oportunidades que me han dado, por enseñarme a perseguir mis sueños a través del trabajo, disciplina, respeto e ilusión. A mi hermana y a mi cuñado, por estar siempre presentes y darme luz cuando lo he necesitado. A mi marido, por su generosidad infinita y apoyo incondicional, mi pilar diario. A mis hijos, por ser el motor de mi vida.

ABREVIATURAS

- **ACTH:** hormona adrenocorticotropa o corticotropina.
- **ACTHoma:** tumor hipofisario secretor de ACTH.
- **ACTB:** Beta actina.
- **AVP:** vasopresina
- **AVPR1b:** receptor de vasopresina subtipo b.
- **CLU 24h:** Cortisol libre en orina de 24 horas.
- **CPN:** Cortisol plasmático nocturno.
- **CRHR1:** receptor de hormona liberadora de corticotropina.
- **CS:** cortisol salival nocturno.
- **DA:** agonistas dopaminérgicos.
- **DM-2:** diabetes tipo 2.
- **DR:** receptor de dopamina.
- **DRD1:** receptor de dopamina subtipo 1.
- **DRD2:** receptor de dopamina subtipo 2.
- **DRD2L:** variante larga del receptor de dopamina del subtipo 2.
- **DRD2S:** variante corta del receptor de dopamina del subtipo 2.
- **DRD3:** receptor de dopamina subtipo 3.
- **DRD4:** receptor de dopamina del subtipo 4.
- **DRD5:** receptor de dopamina subtipo 5.
- **DXT:** dexametasona.
- **EC:** enfermedad de Cushing.
- **FSH:** hormona folículo estimulante.
- **FTH:** factores de transcripción hipofisarios.
- **GH:** hormona de crecimiento.
- **GHRA:** antagonistas periféricos de la hormona de crecimiento.
- **GHRH:** hormona liberadora de hormona del crecimiento.
- **GHSR1a:** receptor de GH tipo 1a.
- **GHSR1b:** receptor truncado de ghrelina.
- **GOAT:** ghrelina-O-acil-transferasa.
- **HbA1c:** hemoglobina glicosilada.
- **HHS:** eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal.

- **HPRT1**: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa.
- **HTA**: hipertensión arterial.
- **IGF-1**: factor de crecimiento insulínico tipo 1.
- **In1-ghrelina**: variante truncada de ghrelina.
- **LH**: hormona luteinizante.
- **MC2R**: receptor tipo 2 de la melanocortina.
- **MKI67**: antígeno KI-67.
- **POMC**: proopiomelanocortina.
- **PTTG1**: gen transformador de tumor hipofisario.
- **PRL**: prolactina.
- **REF**: radioterapia estereotáxica fraccionada.
- **RCE**: radiocirugía estereotáctica.
- **RMN**: resonancia magnética nuclear.
- **SC**: síndrome de Cushing.
- **SSA**: análogos de somatostatina.
- **SSTs**: receptores somatostatina.
- **SST₁**: receptor de somatostatina subtipo 1.
- **SST₂**: receptor de somatostatina subtipo 2.
- **SST₃**: receptor de somatostatina subtipo 3.
- **SST₄**: receptor de somatostatina subtipo 4.
- **SST₅**: receptor de somatostatina subtipo 5.
- **SST₅TMD4**: variante truncada del receptor de somatostatina subtipo 5-TMD4.
- **SST₅TMD5**: variante truncada del receptor de somatostatina subtipo 5-TMD5.
- **TSH**: hormona estimuladora del tiroides o tirotropina.

ÍNDICE

Resumen.	17
1. Introducción.	23
1.1. Hipófisis y tumores hipofisarios.	25
1.2. Hormona adrenocorticotropa.	29
1.3. Enfermedad de Cushing.	32
2. Objetivos.	49
3. Pacientes y métodos.	53
3.1. Pacientes.	55
3.2. Muestras de adenomas corticotropos.	56
3.3. Aislamiento de ARN, transcripción inversa y PCR cuantitativa en tiempo real.	57
3.4. Determinaciones bioquímicas.	58
3.5. Análisis estadístico.	58
4. Resultados.	61
4.1. Características basales.	63
4.2. Estudio molecular del tumor hipofisario productor de ACTH.	65
4.3. Resultados poscirugía transesfenoidal.	68
4.4. Correlación entre los datos clínicos y expresión molecular.	78
5. Discusión.	91
6. Conclusiones.	103
7. Bibliografía.	107
8. Anexo.	121

RESUMEN

RESUMEN

La enfermedad de Cushing (EC) se origina por un tumor hipofisario secretor de hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que suele presentarse en forma de microadenoma en el 95% de los casos. Los tumores hipofisarios secretores de ACTH (ACTHomas) representan el 14% de los adenomas hipofisarios intervenidos. La morbimortalidad de pacientes con EC no controlada es elevada, presentando una tasa de mortalidad estandarizada cinco veces superior a la de la población sana. La EC se asocia con alteraciones metabólicas, de hipercoagulabilidad, cardiovasculares, óseas, cognitivas y psicológicas y, en consecuencia, con un aumento de la mortalidad. La normalización de los niveles de cortisol conduce a una reducción significativa de la morbimortalidad. La cirugía transesfenoidal en pacientes con ACTHoma presenta buenos resultados, siendo un procedimiento seguro y eficaz, pero aun así, la enfermedad persiste en alrededor del 22% de los pacientes con EC tras la cirugía. Además, en los pacientes que consiguen la remisión tras el tratamiento quirúrgico, la recidiva puede ocurrir en más de un 50% de los casos, por lo que es necesario el seguimiento de por vida de estos pacientes. En este contexto, la predicción de la remisión y recidiva posquirúrgica de la EC, es un gran desafío en la práctica clínica, y hasta el momento, no existen biomarcadores útiles para predecirlo con precisión.

Por otro lado, un tratamiento médico eficaz en pacientes en los que la cirugía no esté indicada, es necesario para conseguir el control de los síntomas, una disminución de la morbimortalidad y una mejor calidad de vida. Por tanto, conocer el perfil molecular de estos tumores (ej. expresión de receptores de somatostatina o dopamina) puede ser muy útil para la elección del tratamiento farmacológico más adecuado (ej. análogos de somatostatina, dopamina o la combinación de ambos).

En este sentido y sobre la base de lo expuesto anteriormente, el **objetivo principal** de la presente Tesis doctoral fue determinar si el estudio de los marcadores moleculares de los ACTHomas, las características clínicas y los parámetros bioquímicos-radiológicos, de forma individual o combinada, pueden predecir la remisión o recidiva de la EC. Asimismo, y como **objetivo secundario**, se determinó si las características clínicas y/o los parámetros bioquímicos-radiológicos al diagnóstico

de la EC, pueden predecir la expresión molecular a nivel tumoral. Para llevar a cabo el presente estudio, se diseñó y llevó a cabo un estudio observacional retrospectivo multicéntrico [6 Hospitales Universitarios: Reina Sofía de Córdoba, Virgen del Rocío de Sevilla, de la Ribera (Alzira, Valencia), Politécnico La Fe de Valencia, de Albacete, y General de Alicante], en el que se incluyeron 60 pacientes diagnosticados de EC (88,3 % mujeres), tratados quirúrgicamente, y clínicamente bien caracterizados (datos demográficos, bioquímicos, radiológicos, y patológicos), en los que se disponía de una pieza tumoral tras la cirugía en la que se realizó el estudio molecular del tumor.

En nuestro estudio, la respuesta clínica y el seguimiento a largo plazo en pacientes con EC se evaluaron por remisión después de la cirugía y la presencia de recidiva durante el seguimiento. La remisión se definió como la normalización del cortisol libre en orina de 24 horas (CLU 24 h), el cortisol salival nocturno (CS) y el cortisol tras 1 mg de dexametasona (DXT) en aquellos pacientes que no presentaron insuficiencia suprarrenal después de la cirugía. La insuficiencia suprarrenal se definió como cortisol basal menor de 5 µg/dL, realizado inmediatamente después de la cirugía y al mes después de la cirugía. La recidiva de EC se definió como la reaparición de las características clínicas y bioquímicas del hipercortisolismo después de la remisión inicial: niveles elevados de CLU 24h (1,6 veces el nivel superior de la normalidad) y/o niveles superiores de CS (puntos de corte: 0,27 µg/dL) y/o falta de inhibición del cortisol plasmático después de 1 mg de dexametasona (DXT) (punto de corte: > 1,8 µg/dL). Se analizaron los niveles de cortisol tras 1 mg de DXT al mes de la cirugía en todos los pacientes que no presentaron hipocortisolismo tras la cirugía. Los pacientes fueron tratados de acuerdo con las guías clínicas disponibles. Se realizó cirugía transesfenoideal en todos los pacientes y se obtuvo la muestra tumoral tras ser procesada por los anatomopatólogos de cada hospital. Cada una de estas muestras fue procesada y conservada hasta la realización del estudio molecular en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

El periodo de seguimiento en este estudio fue de 24 - 152 meses tras la cirugía. La edad media al diagnóstico de la EC fue de 40 años (15-78). La mayoría de los casos presentaban al diagnóstico obesidad central, plétora facial, cara de luna llena, astenia y labilidad emocional (más del 80 %). También fue frecuente el hirsutismo y la atrofia

muscular (79,4 y 78,8 % respectivamente). La comorbilidad más prevalente fue la hipertensión arterial (50 %). En el estudio de imagen, 34 pacientes (56,7 %) presentaban microadenomas [mediana \pm RI: macroadenomas (17 \pm 8,5 mm), microadenomas (6 \pm 1,6 mm)]. En la pieza tumoral se analizó el perfil de expresión de los genes de los distintos subtipos de receptores de somatostatina (SSTs) que reveló que el receptor de somatostatina subtipo 5 (SST₅) era el subtipo de receptor dominante expresado en muestras de ACTHoma, seguido de receptor de somatostatina subtipo 1 (SST₁) >> receptor de somatostatina subtipo 2 (SST₂) > receptor de somatostatina subtipo 3 (SST₃) > variante truncada del receptor de somatostatina subtipo 5-TMD5 (SST₅TMD5) > variante truncada del receptor de somatostatina subtipo 5-TMD4 (SST₅TMD4). También se analizó el perfil de receptores de dopamina (DR) y se encontró que el receptor más expresado era el receptor de dopamina subtipo 2 (DRD2), seguido del receptor de dopamina subtipo 4 (DRD4) >> receptor de dopamina subtipo 5 (DRD5) > receptor de dopamina subtipo 1 (DRD1). En el caso del sistema ghrelina, los componentes dominantes de este sistema fueron el receptor truncado de ghrelina (GHR1b) \geq receptor de GH tipo 1a (GHR1a), seguidos de la enzima Ghrelina-O-acil-transferasa (GOAT) \geq variante In1-ghrelina > ghrelina nativa. Se observó que el precursor de la ACTH (POMC), la variante del receptor de vasopresina-1b (AVPR1b) y el receptor de hormona liberadora de corticotropina (CRHR1) se expresaban considerablemente en las muestras de ACTHoma. También encontramos entre los marcadores de proliferación, que los niveles de expresión del gen transformador de tumor hipofisario (PTTG1) eran significativamente más altos que los niveles del antígeno KI-67 (MKI67). Además, los resultados de nuestro estudio mostraron que algunas variables clínicas de la EC se correlacionaban significativamente con variables bioquímicas y moleculares. El hallazgo más relevante fue descubrir que algunos parámetros clínicos/bioquímicos y componentes moleculares se asociaban claramente con la remisión de la EC después de la primera cirugía (ej. menor tamaño del tumor y las determinaciones posquirúrgicas de cortisol basal, CLU 24h, cortisol tras 1 mg DXT y prolactina, menor expresión de SST₁, mayor expresión de CRHR1 y MKI67, etc.), y que la combinación de algunos de estos parámetros clínicos y moleculares podía predecir con gran precisión la remisión de la EC después de la primera cirugía.

Por todo lo anterior, las **principales conclusiones** alcanzadas en esta Tesis son:

- Existen marcadores moleculares de los ACTHomas, concretamente SST₁ y CRHR1, que pueden predecir la remisión de la EC en pacientes tratados con cirugía.
- Existen parámetros clínicos, concretamente el tamaño del tumor y las determinaciones posquirúrgicas de cortisol basal, CLU 24h, cortisol tras 1 mg DXT y prolactina (PRL), que pueden predecir la remisión de la EC en pacientes tratados con cirugía.
- El análisis combinado de dos marcadores moleculares de los ACTHomas (SST₁ y CRHR1) y dos parámetros clínicos (tamaño del tumor y el cortisol basal posquirúrgico) puede predecir con gran precisión la evolución clínica y la remisión de pacientes con EC tratados con cirugía.
- Existe una correlación entre las características clínicas y/o los parámetros bioquímicos-radiológicos al diagnóstico de la EC que pueden predecir la expresión molecular a nivel tumoral. Concretamente, el cortisol basal al diagnóstico se correlaciona inversamente con la expresión de SST₁, SST₂, SST₃, DRD1, DRD2T, DRD2L y DRD5, y el nivel de ACTH al diagnóstico se correlaciona inversamente con la expresión de SST₁, SST₂, SST₃, DRD1, DRD2T, DRD2L, DRD4, DRD5 y GHSR1a.

Por tanto, los resultados de esta Tesis Doctoral aportan una conclusión clínicamente relevante puesto que demuestran por primera vez que el análisis combinado de un conjunto concreto de biomarcadores clínicos y moleculares en la pieza tumoral de pacientes con ACTHomas es capaz de predecir con gran precisión la evolución clínica y la remisión de los pacientes. Por tanto, el perfil molecular posquirúrgico representa una valiosa herramienta para la evaluación clínica y el seguimiento de los pacientes con EC.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hipófisis y tumores hipofisarios

La hipófisis es una glándula endocrina compleja, encargada de regular de forma integrada el funcionamiento de otras glándulas endocrinas. Se localiza en el interior de la silla turca, en la base del cráneo, y está formada por la **adenohipófisis** y la **neurohipófisis**. El tallo hipofisario conecta la hipófisis con la eminencia media del hipotálamo [1].

El hipotálamo está formado por células nerviosas que sintetizan y secretan hormonas peptídicas o aminérgicas, que estimulan o inhiben la secreción de las hormonas hipofisarias, y que se liberan directamente a los vasos portales del tallo hipofisario. El plexo portal hipotálamo-hipofisario es la fuente principal de aporte sanguíneo a la hipófisis anterior, lo que permite una transmisión segura de la secreción pulsátil de péptidos hipotalámicos. La función de las células hipofisarias está regulada por picos de factores de liberación o inhibición hipotalámicos, que da lugar a una liberación hormonal pulsátil. Por otra parte, las hormonas y otras señales periféricas también participan en la modulación de la función de las células hipofisarias, principalmente, a través de una regulación por retroalimentación negativa por parte de las hormonas producidas por sus respectivas glándulas y tejidos diana. Además, existe una regulación por retroalimentación ultracorta, ejercida por la hipófisis sobre sus propias células y sobre el hipotálamo[1].

En la **adenohipófisis**, existen cinco tipos de células secretoras de hormonas. Las células **corticotropas** producen péptidos derivados del POMC, fundamentalmente la ACTH; las células **somatotropas** producen hormona del crecimiento (GH); las células **tiotropas** sintetizan una subunidad glucoproteica α común y la subunidad β específica de tiotropina u hormona estimuladora del tiroides (TSH); las células **gonadotropas** expresan la subunidad α común y las subunidades β de la hormona foliculoestimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH); y las células **lactotropas** producen prolactina (PRL). Cada tipo celular se encuentra bajo una regulación altamente específica, que

controla su expresión genética y actividad funcional diferenciada. La **neurohipófisis**, está formada por axones que se originan en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. Produce dos hormonas: vasopresina (AVP), también conocida como hormona antidiurética, y oxitocina [1].

Los **tumores o adenomas hipofisarios** representan aproximadamente el 10% de todas las neoplasias intracraneales, y generalmente son neoplasias benignas. Se originan a partir uno o varios tipos celulares de la hipófisis anterior. El fenotipo clínico y bioquímico del tumor va a depender del tipo celular del que se origina: lactotropas (PRL), somatotropas (GH), corticotropas (ACTH), tirotropas (TSH) o gonadotropas (LH, FSH). Los tumores hipofisarios pueden manifestarse como adenomas no funcionantes, o como secretores de una o varias hormonas (adenomas hipofisarios funcionantes). Los tumores secretores se caracterizan por tener secreción hormonal autónoma, con escasa respuesta a las vías normales de inhibición. No siempre existe correlación entre la producción hormonal y el tamaño tumoral, existen adenomas pequeños con una activa secreción hormonal que pueden producir alteraciones clínicas importantes, mientras que hay adenomas de mayor tamaño, pero con menor producción hormonal, que pueden ser clínicamente silentes y manifestarse sólo por clínica derivada de los efectos compresivos que puedan producir. Alrededor de la tercera parte los adenomas hipofisarios son adenomas no funcionantes. Por otra parte, existe adenomas hipofisarios productores de más de una hormona, llamados adenomas hipofisarios plurihormonales, y estos suponen menos del 1% [1, 2].

En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publica una nueva clasificación que agrupa los tumores hipofisarios neuroendocrinos en las 3 líneas celulares de la adenohipófisis, cada una de ellas regulada por factores de transcripción hipofisarios (FTH) diferentes y estos pueden estudiarse por inmunohistoquímica en el tejido tumoral [2]. Este agrupamiento facilita una aproximación diferente al diagnóstico patológico de los tumores hipofisarios [3]. Se ha propuesto, además, que en el informe del patólogo figuren también datos clínicos (tumor funcionante/silente, presencia y grado de invasión radiológica), y datos de actividad proliferativa [MIB1-

LI/Ki-67 (MKI67), número de mitosis y p53], con el objetivo de diseñar una clasificación clínico-patológica con capacidad pronóstica (**Tabla 1**).

Tipo de adenoma	Variante morfológica	Hormonas hipofisarias y otros inmunomarcadores	FTH y otros cofactores
Adenoma somatotropo	Densamente granuloso	GH ± PRL ± subunidad α . Patrón perinuclear o difuso de citoqueratinas	PIT-1
	Escasamente granuloso	GH ± PRL, patrón en gota de citoqueratinas	PIT-1
	Mamosomatotropo	GH + PRL (en mismas células) ± subunidad α	PIT-1, ER α
	Mixtosomatotropo-lactotropo	GH + PRL (en células diferentes) ± subunidad α	PIT-1, ER α
Adenoma lactotropo	Densamente granuloso	PRL difusa	PIT-1, ER α
	Escasamente granuloso	PRL perinuclear	PIT-1, ER α
	Acidófilo de células madre	PRL, GH (focal y variable) Patrón en gota de citoqueratinas	PIT-1, ER α
Adenoma tirotrópico		β -TSH ± subunidad α	PIT-1, GATA 2
Adenoma corticotropo	Densamente granuloso	ACTH Patrón difuso de citoqueratinas.	T-PIT
	Escasamente granuloso	ACTH Patrón difuso de citoqueratinas.	T-PIT
	De células de Crooke	ACTH	T-PIT
Adenoma gonadotropo		β -TSH, β -LH ± subunidad α	SF-1, GATA2, ER α
Adenomas de células nulas		Ninguno	Ninguno
Adenoma plurihormonal	Adenoma plurihormonal PIT-1	GH, PRL, β -TSH ± subunidad α	PIT-1
	Adenomas con combinaciones inusuales	Combinaciones diversas: ACTH/GH, ACTH/PRL	N/A

Tabla 1. Clasificación de los tumores hipofisarios. Modificado de la clasificación de la OMS de tumores de la glándula hipofisaria [2] y de la de Picó et al [3].

El consenso de expertos de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición y la Sociedad Española de Anatomía Patológica propone una secuencia diagnóstica

diferente para aquellos centros donde no se puedan medir los FTH de forma rutinaria (Figura 1) [3]. Este esquema permite tipificar de forma correcta los diferentes subtipos de tumores hipofisarios neuroendocrinos en más del 95% de los casos, lo que favorece su tratamiento y seguimiento.

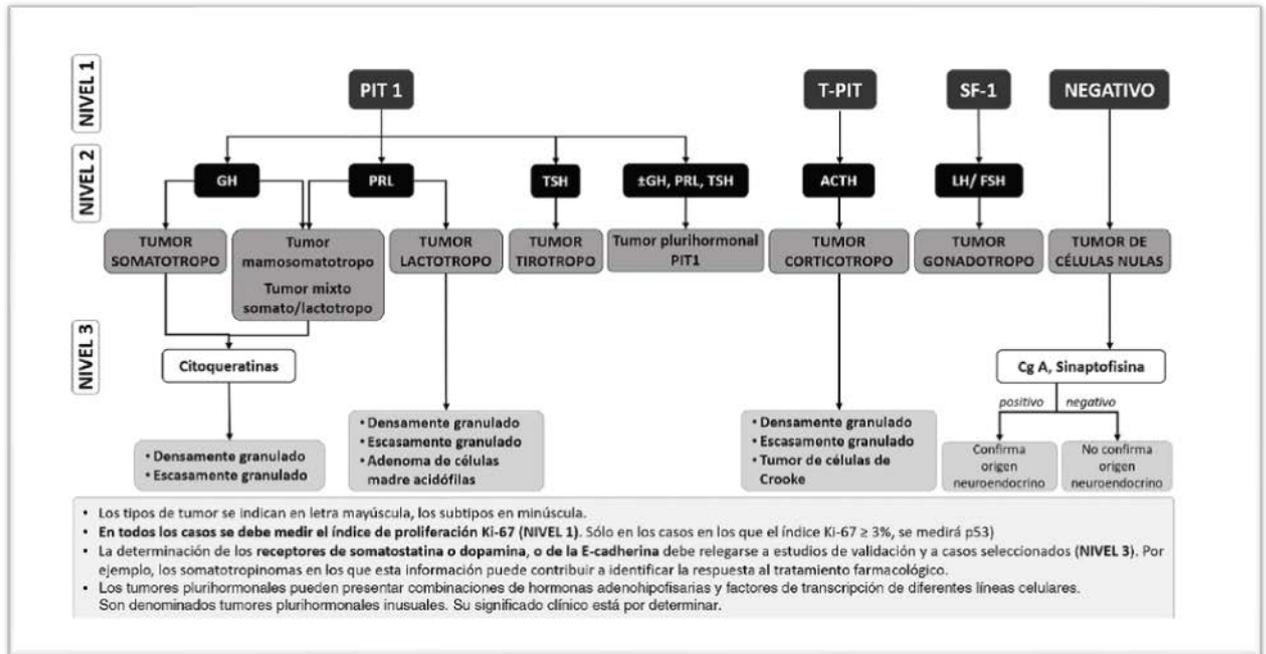


Figura 1. Propuesta de algoritmo diagnóstico de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición y la Sociedad Española de Anatomía Patológica, en base a la determinación en un primer escalón de los factores de transcripción hipofisarios [3]. PIT-1: factor de transcripción 1 específico de la hipófisis; T-PIT: el factor de transcripción t-box; SF-1: factor esteroideogénico-1. ACTH: hormona corticotropa; GH: hormona del crecimiento; FSH: hormona foliculoestimulante; LH: hormona luteinizante; PRL: prolactina; TSH: hormona estimulante de la tiroides. Cg-A: cromogranina A.

Debemos hacer mención, en los adenomas hipofisarios, al PTTG1, oncogén que se encuentra sobreexpresado en una variedad de tumores relacionados con el sistema endocrino, especialmente tumores de hipófisis, tiroides, mama, ovario y útero, así como cánceres no relacionados con el sistema endocrino que afectan el sistema nervioso central, pulmonar y gastrointestinal. La alta expresión de PTTG1 se correlaciona con mal pronóstico clínico. La creciente evidencia apoya un papel multifuncional de PTTG1 en la fisiología celular y en la tumorigénesis [4, 5].

1.2. Hormona adrenocorticotropa

El eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HHS) es el principal sistema neuroendocrino que permite tolerar el estrés y sobrevivir. Los componentes clave de la respuesta al estrés, actúan produciendo niveles adecuados de glucocorticoides, que ejercen efectos pleiotrópicos vitales sobre el aporte de energía, el metabolismo energético, la inmunidad y la función cardiovascular. Las células corticotropas representan aproximadamente un 20% de las células funcionales de la adenohipófisis, y éstas elaboran los péptidos del gen POMC, incluida la **ACTH** (**Figura 2**). En la hipófisis humana adulta normal, la POMC solo se expresa en las células corticotropas. La POMC es el precursor de la ACTH, que actúa sobre las glándulas suprarrenales para inducir la síntesis y secreción de glucocorticoides. Múltiples señales actúan de forma sinérgica para activar la expresión del gen de POMC como la hormona liberadora de corticotropina (CRH), las citocinas, la AVP, las catecolaminas y el péptido vasoactivo intestinal (VIP). Por el contrario, somatostatina y dopamina, actúan inhibiendo su expresión [1].

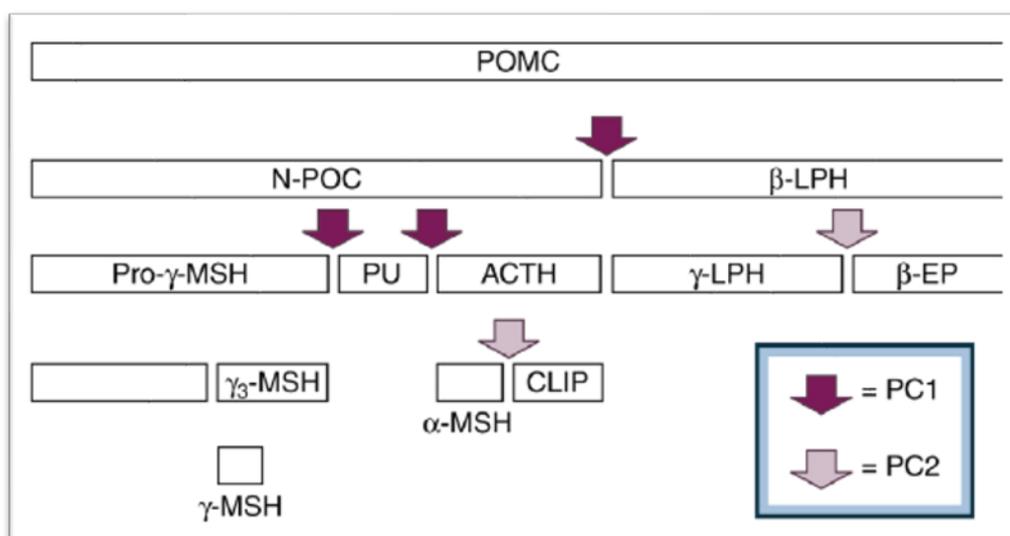


Figura 2. Procesamiento y rotura de la proopiomelanocortina (POMC). El péptido precursor de POMC se procesa de forma secuencial por la acción de la prohormona convertasa 1 (PC1) en la corticotropa adenohipofisaria. En el lóbulo intermedio neural y otros tipos celulares, el procesamiento mediado por PC2 determina la liberación de α -MSH, β -EP, γ -LPH o ambos [1]. ACTH: hormona adrenocorticotropa; CLIP: péptido del lóbulo intermedio parecido a la corticotropina; LPH: lipotropina; MSH: hormona estimulante de los melanocitos; N-POC: fragmento N-terminal de pro-POMC; PU: péptido de unión.

La ACTH completa es el único péptido derivado de la POMC con función adrenocorticotropa, y es el ligando del receptor tipo 2 de la melanocortina (MC2R). La activación de MC2R determina, en las suprarrenales, la producción de glucocorticoides, esteroides androgénicos y, en menor medida, mineralocorticoides. Al igual que sucede con otras hormonas de la adenohipófisis, la regulación de ACTH comprende al menos tres niveles de control. En primer lugar, el encéfalo y el hipotálamo liberan moléculas reguladoras como CRH, AVP, dopamina y somatostatina que circulan por el sistema porta y regulan, de forma directa, la función corticotropa. En segundo lugar, las citocinas intrahipofisarias y factores de crecimiento actúan a nivel local y regulan ACTH, de forma independiente o en coordinación con los factores hipotalámicos. Estos controles paracrinos se suelen solapar, e inducen moléculas intracelulares sensibles, que limitan la respuesta de ACTH, evitando una hipersecreción crónica de ésta. En tercer lugar, los glucocorticoides mantienen un control de retroalimentación regulador de la secreción de las células corticotropas, porque inhiben de forma rápida la secreción de CRH hipotalámica y ACTH hipofisaria [1].

También se ha descrito que ghrelina, péptido de 28 aminoácidos producido predominantemente por el estómago, es un ligando natural del GHSR1a que actúa estimulando la secreción de GH y ejerce un efecto estimulador agudo sobre la actividad del eje HHS en humanos, similar a la acción de AVP e incluso similar a CRH [6]. Ghrelina estimulan el eje HHS de forma independiente a través del hipotálamo, lo que implica la estimulación de CRH, AVP y el neuropéptido Y. En los ACTHoma, el GHSR1a se expresa patológicamente, lo que explica las respuestas especialmente altas de ACTH y cortisol a la ghrelina en pacientes con EC [7, 8]. El sistema de ghrelina comprende una familia compleja de péptidos, receptores y enzimas modificadoras, como GOAT, que controlan múltiples procesos fisiopatológicos. Se ha descrito que las variantes truncadas de ghrelina (In1-ghrelina) y del receptor de ghrelina (GHSR1b) pueden promover el desarrollo/progresión de ciertos cánceres relacionados con el sistema endocrino [9, 10].

Las células corticotropas hipofisarias normales expresan receptores de somatostatina o SSTs. La somatostatina es una hormona pleiotrópica, esencialmente

de naturaleza inhibitoria. Entre sus funciones, se encuentra el efecto inhibitor que ejerce sobre la secreción de varias hormonas de la adenohipófisis, tales como la GH y también la ACTH [11]. Las diferentes acciones de la somatostatina son mediadas por sus receptores, localizados en la membrana plasmática de las células diana. Estos receptores, en su forma canónica, son proteínas de 7 dominios transmembrana (DTM), que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas. Se han descrito cinco subtipos de SSTs (SST₁-SST₅) codificados por diferentes genes. Existen además dos variantes truncadas del SST₅, generadas por un proceso de splicing alternativo anómalo, que carecen de algunos DTM, y se nombran por ello SST₅TMD4 y SST₅TMD5 [12]. En la adenohipófisis normal se expresan todos los subtipos canónicos excepto el SST₄ [11]. Se ha observado expresión diferencial de SSTs en los adenomas hipofisarios dependiendo del tipo celular del que derivan [12, 13]. En concreto, SST₂ y SST₅ son los subtipos predominantes en la mayoría de los tumores hipofisarios, sin embargo, en los ACTHomas se observa un predominio en la expresión de SST₅ y niveles relativamente bajos de SST₂ [14]. La expresión relativamente baja de SST₂ parece deberse al efecto supresor de niveles elevados de cortisol, siendo la expresión de SST₅ menos sensible a este efecto [15].

Los receptores de dopamina o DR, al igual que los SSTs, están involucrados en la regulación del eje HHS, y pertenecen también a la familia de receptores con 7 DTM acoplados a proteínas G. Se han descrito cinco subtipos: DRD1, DRD2, subtipo 3 (DRD3), DRD4 y DRD5 [16]. DRD1 y DRD5 son preferencialmente estimuladores, mientras que DRD2, DRD3 y DRD4 son principalmente inhibitorios. DRD2 y, en menor medida DRD4, son los subtipos que se expresan mayoritariamente en adenohipófisis [17]. Los ACTHoma expresan predominantemente DRD2 [18]. DRD2 presenta dos isoformas, una larga (DRD2L) y otra corta (DRD2S); ambas isoformas tienen la misma capacidad para unir su ligando, pero DRD2L se expresa unas diez veces más que DRD2S y tiene menor capacidad de acoplarse a proteína G [19]. La diferencia más relevante, desde el punto de vista fisiopatológico, entre ambas isoformas es la respuesta a la exposición prolongada a agonistas dopaminérgicos (DA), pues ambas isoformas experimentan una internalización tras exposición prolongada, sin embargo, el grado de

internalización de DRD2S es mayor que el de DRD2L, siendo este último más resistente a la desensibilización que presentan estos receptores al tratamiento con DA [20].

La principal acción de la ACTH es mantener el tamaño, estructura y función de las glándulas suprarrenales. ACTH induce la esteroidogénesis suprarrenal por MC2R en la corteza suprarrenal. La transmisión de señales de ACTH regula la producción de cortisol, aldosterona (10%), 17-hidroxiprogesterona y, en menor medida, los andrógenos suprarrenales. ACTH estimula el transporte mitocondrial de colesterol y regula la escisión de cadenas laterales de colesterol a pregnenolona, que es el paso limitante de la reacción. Los pulsos de secreción de cortisol siguen el patrón de los pulsos de ACTH con 5-10 min de desfase, y existe una dependencia lineal de la dosis que resulta especialmente evidente después de la estimulación fisiológica con CRH. La secreción de ACTH, tanto basal como estimulada, se regula por los niveles de glucocorticoides. Por el contrario, la ausencia o baja concentración de glucocorticoides circulantes se traduce en un aumento exagerado de la secreción de ACTH y en una hiperplasia de las células corticotropas [1].

1.3. Enfermedad de Cushing

La EC se origina por un tumor hipofisario secretor de ACTH que se presenta en el 95% de los casos como un microadenoma. Es la causa más frecuente de hipercortisolismo endógeno, representado el 80% de los casos. El 14% de los adenomas hipofisarios intervenidos son adenoma hipofisario secretor de ACTH. La incidencia de EC oscila entre 0,7 y 2,4 casos por millón de habitantes/año. Esta enfermedad es más frecuente entre la tercera y cuarta década de la vida y es ocho veces más frecuente en mujeres [21, 22].

* **CLÍNICA:** La EC comprende síntomas y signos asociados a una exposición prolongada de niveles inapropiadamente elevados de glucocorticoides. El tamaño del tumor, no se correlaciona necesariamente con el grado de hipercortisolismo en la EC. De hecho, los pacientes con adenomas más grandes pueden presentar un hipercortisolismo más leve

[23]. La clínica es común a la del SC de cualquier origen (**Tabla 2**) [1, 22]. En ocasiones, el SC puede ser cíclico, caracterizándose por períodos de hipercortisolemia transitoria, que alterna con períodos de normo y/o hipocortisolemia. El diagnóstico del SC cíclico se basa en al menos tres períodos de hipercortisolemia confirmada, intercalados por dos períodos de normocortisolemia [24].

Clínica	Frecuencia (%)
Obesidad central	80
Plétora facial	94
Atrofia cutánea	80
Cara de luna llena	88
Lipomatosis cervical	75
Grasa supraclavicular	75
Hirsutismo	85
Atrofia muscular	50
Amenorrea	84
Estrías rojizas	56
Fragilidad capilar	65
Acné	45
Edemas en miembro inferiores	50
Cefalea	43
Astenia	85
Alteración visual	5
Hipertensión arterial	74
Dislipemia	20
Diabetes tipo 2	50
Osteoporosis	50
Disfunción psiquiátrica	62

Tabla 2. Características clínicas del síndrome de Cushing y prevalencia.

La morbimortalidad de pacientes con EC no tratados, o no controlada es alta. Los pacientes con EC activa presentan una tasa de mortalidad estandarizada cinco veces superior a la de la población sana. La hipercortisolemia se asocia con alteraciones metabólicas, de hipercoagulabilidad, cardiovasculares, óseas, cognitivas y psicológicas y, en consecuencia, con un aumento de la mortalidad [22, 25]. La normalización de los niveles de cortisol conduce a una mejora significativa de estos parámetros y, por lo tanto, a una disminución de la morbimortalidad [26, 27]. Sin embargo, cada vez hay más pruebas que indican que el riesgo de desarrollar ciertas morbilidades, en particular enfermedades cardiovasculares, se mantiene durante varios años después de la remisión de la EC [27, 28]. Además, el hipercortisolismo inhibe la secreción de la GH, produciendo una deficiencia de ésta, que puede mantenerse incluso años después de la remisión del SC [22, 29].

Los factores de riesgo cardiovascular persisten con una prevalencia notable en pacientes con remisión de la EC: obesidad/sobrepeso en el 40%, hipertensión arterial (HTA) en el 60%, diabetes tipo 2 (DM-2) o intolerancia a la glucosa en el 60% y dislipemia hasta en el 30% de los pacientes [30, 31]. El estado de hipercoagulabilidad no es reversible con la remisión a corto plazo, siendo parcialmente reversible con la remisión a largo plazo [32]. La densidad mineral ósea tampoco se recupera completamente en todos los pacientes [33]. La psicopatología, por su parte, puede disminuir después de la remisión de forma dependiente del tiempo, aunque su prevalencia es alta después de la remisión a largo plazo. La función cognitiva con frecuencia sigue estando alterada tras la remisión, lo que sugiere efectos irreversibles del hipercortisolismo crónico a nivel cerebral. A pesar de la remisión de la EC, la calidad de vida de estos pacientes sigue estando afectada, con mayor intensidad en aquellos que presentan hipopituitarismo [34]. En general, la duración del hipercortisolismo en la EC parece estar inversamente relacionada con la reversibilidad de las diferentes complicaciones, lo que puede aumentar la mortalidad. Esto indica que el diagnóstico temprano de la EC es de suma importancia y, una vez establecido, se debe normalizar la producción de cortisol lo antes posible [22, 35].

* **DIAGNÓSTICO:** El diagnóstico de la EC se puede retrasar durante años, en parte, debido a su presentación clínica, en muchas ocasiones poco específica y, en parte, a su complejidad diagnóstica [22]. Para el diagnóstico de la EC, es preciso establecer previamente el diagnóstico de SC (**Figura 3**). Las pruebas de cribado y diagnóstico del SC evalúan el estado de secreción de cortisol: ritmo circadiano anormal con el CS, alteración de la retroalimentación de glucocorticoides con la prueba de supresión de cortisol tras 1 mg DXT o prueba de supresión de cortisol con DXT a dosis baja durante 2 días, y mayor biodisponibilidad de cortisol con la determinación de CLU 24h [22]. La sensibilidad de todas las pruebas es superior al 90% (**Tabla 3**). Las tasas de sensibilidad más altas las presentan la determinación de cortisol tras 1 mg de DXT y el CS, siendo más bajas con CLU 24h. La especificidad es algo menor que la sensibilidad, siendo la determinación de CS la más específica [22]. El proceso diagnóstico de la EC se describe en la **figura 3** [22, 36].

Prueba diagnóstica	Valor anormal	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Cortisol tras 1 mg DXT	Mayor 1.8 mcg/dL	98	81
Cortisol libre en orina de 24 horas	Rango de referencia específico	91	81,5
Cortisol salival nocturno	Rango de referencia específico	97	97,5

Tabla 3. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de síndrome de Cushing.

En los ACTHoma, los receptores de glucocorticoides suelen conservar la capacidad de inhibir la secreción de ACTH en presencia de dosis altas de DXT y los receptores de vasopresina V2 y V1b (V3), junto con el receptor de CRH, están sobreexpresados. Por el contrario, la mayoría de los tumores ectópicos secretadores de ACTH no expresan estos receptores. En consecuencia, las pruebas de estimulación con desmopresina y CRH han demostrado ser útiles para diferenciar entre tumores hipofisarios y ectópicos [37]. En la EC, generalmente, se produce un aumento de la

ACTH plasmática y de la concentración de cortisol después de la administración de CRH o desmopresina [38]. La utilidad de la prueba de estimulación con CRH tras la supresión con DXT en el diagnóstico de la EC, se fundamenta en que sólo los pacientes con SC ACTH dependiente presentan una respuesta positiva de cortisol tras el estímulo con CRH [39]. Sin embargo, la fiabilidad de esta prueba puede ser variable, dependiendo de la experiencia del centro y de las características del paciente [22]. La prueba de desmopresina se basa en el hallazgo de que los ACTHomas expresan receptores de vasopresina V1b (también conocidos como receptores de vasopresina 3), produciéndose un aumento en la concentración plasmática de ACTH después de la inyección de desmopresina [40]. La prueba de desmopresina tiene una alta especificidad para el diagnóstico de EC [41], y es más accesible que la prueba de estimulación de CRH. No obstante, ambas pruebas han mostrado un buen rendimiento para el diagnóstico de EC, y cuando se hacen ambas pruebas se ha observado una excelente concordancia [42, 43].

La resonancia magnética (RM) con contraste es la técnica de imagen de elección para detectar adenomas hipofisarios secretores de ACTH. Sin embargo, con la RM estándar de 1,5 T, sólo aproximadamente el 50 % de los microadenomas se visualizan claramente. Con la utilización cada vez más generalizada de la RM de 3T, hasta un tercio de las exploraciones en pacientes con EC siguen siendo no diagnósticas [44].

El cateterismo de senos petrosos es la técnica con mayor precisión para establecer diagnóstico diferencial entre EC y SC ectópico cuando la RM no ha sido diagnóstica (**Figura 3**). En la EC se objetiva un incremento de ACTH en senos petrosos en relación con su concentración a nivel periférico [45]. El cateterismo de senos petrosos presenta una sensibilidad y especificidad del 92-100% para el diagnóstico de microadenomas productores de ACTH [46] y predice la lateralidad del microadenoma en el 60-84% de los casos si en un seno petroso demuestra un nivel de ACTH 1,4 veces mayor con respecto al seno petroso contralateral, aunque su valor para identificar la localización del adenoma productor de ACTH dentro de la glándula hipofisaria es limitada [45, 47-50].

La utilización de más de una prueba dinámica podría mejorar la precisión diagnóstica [51]. Sin embargo, los tumores neuroendocrinos bien diferenciados también pueden expresar estos receptores, y llevar a diagnóstico erróneo. La prueba de supresión con 8 mg DXT tiene una baja precisión diagnóstica, y su uso es limitado. Ninguna de las pruebas diagnósticas tiene una especificidad del 100 % y los resultados pueden ser discordantes hasta en un tercio de los pacientes [22, 36]. Se recomienda completar el estudio con tomografía computarizada (TAC) corporal, en aquellos pacientes en los que el RM hipofisaria y el cateterismo de senos petrosos no han establecido el diagnóstico [22, 36]. La combinación de pruebas diagnósticas de una TAC corporal positiva, junto con una prueba de estimulación con CRH y desmopresina negativa, y una RM hipofisaria negativa, han reportado un valor predictivo negativo del 100% para la EC [52]. En el último consenso se propone este nuevo esquema como alternativa al cateterismo para aquellos centros en los que éste no esté disponible (**Figura 3**) [22].

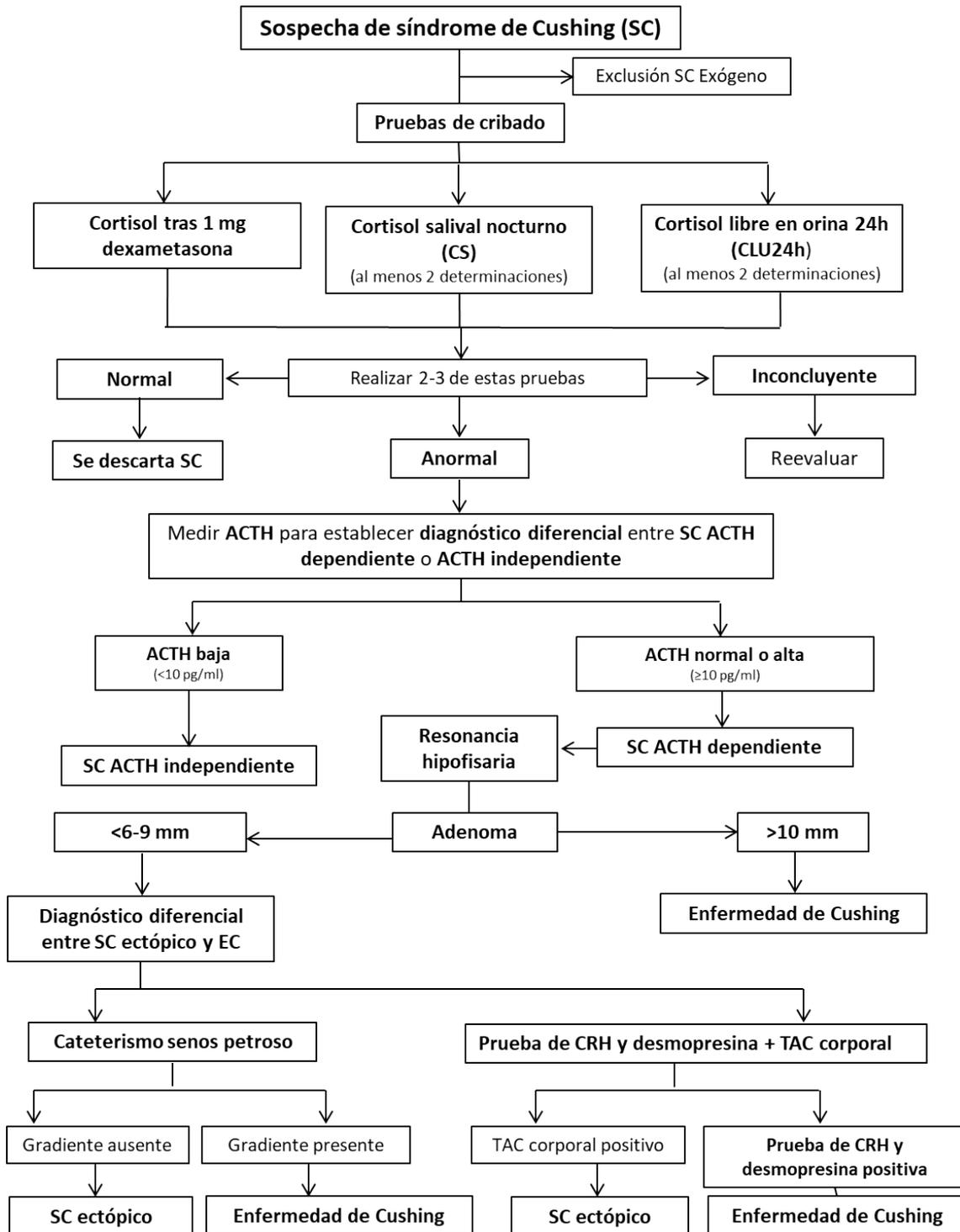


Figura 3. Proceso diagnóstico de la enfermedad de Cushing.

* **TRATAMIENTO:** En general, la cirugía se considera el tratamiento de elección en los pacientes diagnosticados de EC [22, 53]. Otras opciones son el tratamiento médico o la radioterapia [22, 53].

- **Cirugía:** La cirugía transesfenoidal en pacientes con tumores hipofisarios presenta buenos resultados, y las complicaciones quirúrgicas son bajas, especialmente en microadenomas [54]. Aunque la exéresis transesfenoidal del ACTHoma es un procedimiento seguro y eficaz, la enfermedad persiste en alrededor del 22% de los pacientes con EC debido a la resección incompleta del tumor [55]. Tras el tratamiento quirúrgico, el seguimiento de estos pacientes debe ser estrecho, con objeto de evaluar la posibilidad de persistencia de la EC tras la cirugía o confirmar la remisión del hipercortisolismo. La recidiva después de lograr la remisión quirúrgica ocurre en más de un 50% de los casos según las series publicadas [22, 53, 55-57].

La cirugía transesfenoidal endoscópica en la EC puede considerarse, en la actualidad, la técnica más adecuada de abordaje quirúrgico, obteniendo resultados comparables para los microadenomas, y probablemente, mejores resultados para los macroadenomas, que la cirugía microscópica. La cirugía microscópica se puede utilizar según la preferencia del neurocirujano [58].

Tras el diagnóstico de recidiva se puede considerar una nueva cirugía transesfenoidal si no existe contraindicación, si se visualiza el tumor en las pruebas de imagen, o si no se visualiza pero al diagnóstico el cateterismo de senos petrosos determinó gradiente central. La remisión tras una segunda intervención quirúrgica es menos probable [22].

- **Tratamiento médico:** El tratamiento médico en la EC está indicado en el momento del diagnóstico para conseguir la normalización de los niveles de cortisol, en pacientes con EC persistente o recidiva y que no son candidatos a la reintervención quirúrgica, en pacientes que no sean candidatos a tratamiento quirúrgico o rechacen esta opción terapéutica, y para controlar las concentraciones de cortisol en pacientes sometidos a

radioterapia. En la actualidad, el tratamiento médico de la EC se fundamenta en las bases moleculares de esta enfermedad. Las distintas modalidades terapéuticas se resumen en la **tabla 4** [22, 53, 59-62].

Lugar de acción	Grupo terapéutico	Acción
Adenohipófisis	Análogos de somatostatina	Descenso de ACTH
	Agonistas dopaminérgicos	
Suprarrenales	Ketoconazol	Descenso de cortisol
	Osilodrostat	
	Mitotano	
	Metirapona	
	Etomidato	
Receptores cortisol	Mifepristona	Antagoniza el receptores de glucocorticoides.

Tabla 4. Resumen de terapias médicas actualmente disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Cushing.

Las opciones terapéuticas médicas dirigidas a nivel hipofisario son los análogos de la somatostatina (SSA) y DA [22, 53, 61].

Como ya se ha referido anteriormente, en los ACTHomas se ha observado un predominio en la expresión de SST₅, seguido de SST₂ [14, 63, 64]. Las células corticotropas hipofisarias normales y tumorales expresan SST₅ y SST₂, y en menor medida SST₁, siendo SST₅ el subtipo de receptor más abundante y predominante. La somatostatina inhibe la secreción de ACTH in vitro, pero la sensibilidad a la somatostatina está fuertemente regulada por los glucocorticoides. Debido a estas características, el SST₅ se ha convertido en una diana terapéutica de relevancia creciente para el tratamiento médico de EC [64]. En este sentido, los SSA son una alternativa terapéutica para inhibir la secreción de ACTH, actuando a través de la activación de uno o varios SSTs. Dentro de los SSA se encuentran, octreotida, lanreotida y pasireotida, que difieren en su afinidad específica a uno o varios SSTs. En concreto, octreotida y lanreotida presentan afinidad preferencial por el SST₂, no

habiendo demostrado acción supresora en la secreción de ACTH ni descenso en los niveles de cortisol en pacientes con EC [53, 64]. En cambio, pasireotida, un SSA de más amplio espectro con afinidad por SST₂ y SST₅, es capaz de inhibir la secreción de ACTH en adenomas corticotropos, y ha demostrado en los diferentes ensayos clínicos la disminución o normalización de niveles de CLU, y también la posibilidad de reducir el tamaño tumoral, siendo actualmente una opción terapéutica para los pacientes con persistencia EC tras tratamiento quirúrgico, o para aquellos en los que la cirugía está contraindicada [26, 60, 65-70].

Por su lado, como también se ha comentado con anterioridad, los ACTHoma expresan DR, predominantemente DRD2 [16, 18]. La expresión de DR en los adenomas corticotropos se correlaciona positivamente con los efectos supresores de la DA, disminuyendo los niveles de cortisol en pacientes con EC [17]. El tratamiento con cabergolina normaliza los niveles de cortisol en aproximadamente el 40% de los pacientes con EC, por lo tanto, el DRD2 es una diana terapéutica importante para el tratamiento de la EC. Pero, a diferencia de los efectos observados con pasireotida, cabergolina puede presentar el denominado “efecto escape” en un 25-40% de los pacientes tratados con este fármaco, explicado por la desensibilización de los debida a la internalización de estos receptores, tras exposición prolongada al tratamiento con DA, siendo DRD2L más resistente a la desensibilización que DRD2S [20, 22, 26, 60, 71-73].

Se ha demostrado en humanos que, DRD2 puede formar heterodímeros con varios SST, fundamentalmente con SST₂ y SST₅, y que la composición específica de estos heterodímeros pueden alterar la respuesta a DA y SSA [18]. Esta posible relación entre DR y somatostatina ha impulsado el desarrollo de agonistas quiméricos DRD2/ SST₂/ SST₅ para el uso terapéutico [18, 74]. Se ha descrito la existencia de una coexpresión de SST₅ y DRD2 en aproximadamente el 60% de los ACTHomas, y en el 30% de ellos se ha observó un nivel de SST₂ relativamente bajo [13]. De acuerdo con estos hallazgos, el tratamiento combinado de pasireotida y cabergolina puede ser útil en pacientes con EC. Todo ello sugiere, que el éxito del tratamiento de los adenomas hipofisarios con DA

y SSA puede depender del patrón de expresión de los distintos subtipos de receptores de dopamina y somatostatina. En pacientes con hipercortisolismo moderado o severo, la remisión bioquímica, por lo general, sólo se consigue con la combinación de varias modalidades terapéuticas [22, 35].

Los inhibidores de la esteroidogénesis suprarrenal (**Tabla 4**), actúan bloqueando una o varias enzimas suprarrenales, inhibiendo la síntesis de glucocorticoides. Son eficaces para controlar el exceso de cortisol, pero no actúan sobre el ACTHoma, ni restauran el ritmo circadiano del eje HHS [75]. Estos fármacos consiguen normalizar los niveles de cortisol en la mayoría de los casos, pero presentan riesgo de desarrollar insuficiencia suprarrenal, además de aumentar los niveles de ACTH y aumentar hormonas suprarrenales próximas al bloqueo que inducen, con actividad mineralocorticoide o androgénica [22, 76]. En nuestro medio, los fármacos más utilizados de este grupo en pacientes con EC son el ketoconazol, y en menor medida, la metirapona. Ketoconazol es ampliamente utilizado en el SC, y estudios retrospectivos han descrito que aproximadamente el 65 % de los pacientes presentan normalización del CLU 24h inicialmente, pero el 15-25 % escapan al control inicial [22, 60, 75, 76]. Metirapona, en estudios retrospectivos ha demostrado normalizar el CLU 24h en aproximadamente 70%, presentando hasta un 18% de escape tras el control inicial [22, 60, 75-77].

El tercer grupo terapéutico (**Tabla 4**), el bloqueador del receptor de glucocorticoides, mifepristona, es eficaz para controlar algunos efectos claves del hipercortisolismo, principalmente la hiperglucemia y el aumento de peso, independientemente de la causa del SC. Actualmente, su uso no está generalizado en la práctica clínica por su dificultad en el manejo, ya que, con frecuencia, empeora la hipopotasemia y no existen marcadores bioquímicos fiables para monitorear las concentraciones de cortisol, aumentando el riesgo de insuficiencia suprarrenal [22, 78].

En definitiva, el tratamiento médico para los pacientes con EC es una opción razonable en aquellos casos en los que esté contraindicada la cirugía, aparezca recidiva de la enfermedad, o en pacientes que eligen no someterse a la cirugía [62]. En aquellos pacientes en los que aparezcan efectos secundarios, o el tratamiento no sea eficaz, se debe considerar un cambio de tratamiento, o una terapia combinada [22, 62].

El tratamiento médico preoperatorio se debe plantear en los pacientes con clínica grave secundaria al hipercortisolismo cuando el tiempo desde el diagnóstico hasta la cirugía se estime prolongado [59, 79]. En la actualidad, no existe evidencia que confirme la necesidad de tratamiento preoperatorio en otras circunstancias clínicas [22]. Las encuestas médicas muestran que el tratamiento médico preoperatorio más utilizado son los inhibidores de la esteroidogénesis suprarrenal, ketoconazol o metirapona, que se utilizan hasta en un 20% de los pacientes con EC, especialmente en pacientes con hipercortisolismo severo o adenoma no visible [79]. Estudios retrospectivos informan que el tratamiento preoperatorio con inhibidores de la esteroidogénesis durante una media de 4 meses antes de la cirugía, normaliza los niveles de cortisol en un 50 – 72%, aunque la mejoría clínica de los síntomas sólo se reportó en un tercio de los pacientes [80, 81]. La recuperación del eje HHS en el periodo preoperatorio puede favorecer la aparición del hipocortisolismo posquirúrgico y este hecho dificulta valorar la remisión de la EC tras la cirugía [22]. Para pacientes con enfermedad grave, en los que la normalización rápida del cortisol sea una prioridad, el uso de osilodrostat o metirapona debe plantearse para obtener la respuesta en horas, ya que con ketoconazol la respuesta es más lenta. Etomidato intravenoso también presenta una acción rápida, y es la opción más adecuada en los pacientes en los que no sea posible la vía oral [22].

La elección del tratamiento médico en los pacientes con EC debe de ser individualizada. Los inhibidores de la esteroidogénesis suprarrenal generalmente se usan como primera línea, por su eficacia en la reducción de los niveles de cortisol, generalmente, se utiliza ketoconazol. La cabergolina se puede utilizar en EC leve, pero es menos efectiva y tiene un inicio de acción más lento. Para pacientes con

enfermedad leve a moderada, y tumor residual, sería preferible utilizar cabergolina o pasireotida debido al potencial de reducción del tumor. En pacientes en los que no se consiga control clínico y bioquímico, la combinación de tratamientos que actúen a diferentes niveles es la opción a considerar [22, 53].

- **Radioterapia:** En el tratamiento de la EC, la radioterapia se utiliza principalmente como terapia adyuvante para pacientes con enfermedad persistente tras la cirugía o recidiva, o por crecimiento tumoral agresivo [82]. Aproximadamente dos tercios de los pacientes tratados con radioterapia alcanzan la remisión en los años posteriores al tratamiento. Habitualmente, el tratamiento consiste en radioterapia estereotáxica fraccionada (REF) (45-50 Gy en sesiones de 2 Gy), o radiocirugía estereotáctica (RCE) (habitualmente dosis única de aproximadamente 20 Gy) [83]. La indicación de RCE se establece si existe una distancia de al menos 3-5 mm entre la tumor y el quiasma óptico [84]. Estudios recientes con RCE muestran resultados con elevadas tasas de remisión con un control bioquímico en un 80% de los casos y control del tamaño del tumor en el 95% [83, 85, 86]. La RCE también se puede utilizar como tratamiento inicial en pacientes con alto riesgo quirúrgico o que rechazan la cirugía [87]. Dada la latencia hasta la remisión post-radioterapia, es necesario el tratamiento médico adyuvante para controlar el hipercortisolismo y la reevaluación periódica del paciente [22, 53]. El hipopituitarismo es el efecto secundario más frecuente tanto la radioterapia convencional como la RCE, apareciendo en el 25-50% de los pacientes, y generalmente aumenta con el tiempo. El riesgo de malignidad secundaria, daño del nervio craneal y el accidente cerebrovascular son también posibles efectos secundarios de la radioterapia, menos frecuentes con RCE [84].

- **Adrenalectomía bilateral:** La adrenalectomía bilateral se plantea en pacientes con EC persistente o recidiva, que no responde al tratamiento médico [22, 53]. Sólo se debe considerar para pacientes seleccionados, en los que han fracasado o las opciones descritas anteriormente, debido a la insuficiencia suprarrenal resultante y la necesidad de tratamiento sustitutivo con glucocorticoides y mineralocorticoides de por vida [88]. La adrenalectomía bilateral laparoscópica se ha asociado con una tasa de

complicaciones del 10-18%, y una tasa de mortalidad de menos del 1% [89]. La mejoría clínica tras la adrenalectomía bilateral se ha descrito en el 80% de los pacientes [90]. La progresión del ACTHoma tras la suprarrenalectomía se ha descrito en el 25-40% de pacientes tras 5-10 años de seguimiento [90, 91]. En estos casos, las opciones de tratamiento serían la cirugía, radioterapia o terapia médica [92].

* **SEGUIMIENTO:** La remisión postoperatoria en la EC se observa en aproximadamente el 80% de los pacientes con microadenomas, y en el 60% de los que presentan macroadenomas, si se realiza el procedimiento por un cirujano experimentado [59, 93].

La remisión de EC tras la cirugía se confirma en aquellos pacientes que presentan insuficiencia suprarrenal después de la cirugía (cortisol basal menor de 5 µg/dL), o que sin presentar insuficiencia suprarrenal posquirúrgica, normalizan los niveles de CLU 24h, CS y cortisol tras la supresión con 1 mg de DXT [22, 56]. Los pacientes con hipercortisolismo leve, EC cíclica o aquellos que han recibido tratamiento médico antes de la cirugía pueden alcanzar la remisión sin un marcado hipocortisolismo postoperatorio. Centros con un equipo de cirujanos expertos y características del tumor como su visualización en la RM hipofisaria, ausencia de invasión de estructuras vecinas, y un tamaño menor de 10 mm parecen correlacionarse con mayores tasas de remisión. Por el contrario, se ha sugerido que en macroadenomas, invasión de estructuras vecinas y los factores histológicos agresivos se correlacionan con mayores tasas de recidiva [94, 95]. Características clínicas preoperatorias, incluida la edad, sexo, duración de la EC y la gravedad de los signos y síntomas clínicos no se han identificado como predictores de mayor riesgo de recidiva [21, 96]. La severidad bioquímica prequirúrgica del hipercortisolismo no se ha relacionado de forma consistente con los resultados postoperatorios. Sin embargo, los niveles preoperatorios más altos de ACTH se han asociado con tasas más bajas de remisión bioquímica [57]. El grado de hipocortisolismo en el postoperatorio se ha propuesto como un predictor potencial de recidiva a largo plazo de la EC. La duración de la insuficiencia adrenal postoperatoria se correlaciona inversamente con el riesgo de recidiva [57]. Numerosos estudios han demostrado una

menor tasa de recidiva en pacientes con niveles de cortisol postoperatorios bajo, que en pacientes con niveles normales o elevados [97, 98]. Sin embargo, se ha descrito la recidiva de la EC en aproximadamente el 10% de los pacientes con niveles bajos de cortisol posquirúrgico (< 2 mcg/dL), o incluso indetectables [99]. Por el contrario, algunos pacientes con cortisol sérico posoperatorio elevado, logran una remisión sostenida a largo plazo. Por ello, hasta el momento, no hay descrito un valor de corte de cortisol plasmático que excluya el riesgo de recidiva [21, 98].

La recidiva de EC a largo plazo oscila entre un 5-50%, y el 50% ocurren durante los primeros 50 meses después de la primera cirugía [56, 100]. Las pruebas de laboratorio indicadas para el seguimiento postoperatorio se especifican en la **tabla 5** [22, 56].

Prueba diagnóstica	Valor anormal	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Cortisol salival nocturno	0,27 mcg/dL	75-90	93-95
Cortisol libre en orina de 24 horas	1,6 x límite de referencia	68	100
Test de desmopresina	Incremento de cortisol de 7 -7,4 µg/dL del nivel basal	68	95
Cortisol tras 1 mg DXT	Mayor 1.8 mcg/dL	No descrito	No descrito

Tabla 5. Pruebas de laboratorio para el seguimiento de la enfermedad de Cushing.

El diagnóstico de recidiva se establece con la reaparición de las características clínicas y bioquímicas del hipercortisolismo después de la remisión [22, 56, 101]. Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de recidiva de EC, a diferencia de en el diagnóstico inicial, presentan una sensibilidad más baja, pero mayor especificidad (**Tabla 5**). El CS puede ser el más sensible para detectar la recidiva y el CLU 24h, generalmente, es la última prueba en mostrarse elevada [102, 103]. El seguimiento para detectar recidiva de EC debe realizarse tras la recuperación del eje HHS. Se ha de tener en cuenta, de forma individualizada en cada paciente, qué pruebas se mostraron patológicas en el diagnóstico. Si en el seguimiento, sólo se observan ligeras anomalías bioquímicas sin características clínicas de hipercortisolismo, se recomienda vigilancia

estrecha para poder determinar la presencia o no de recidiva [22]. En aquellos pacientes que respondieron antes de la cirugía a la prueba de desmopresina, la pérdida de la respuesta posoperatoria podría predecir el riesgo de recidiva [37].

Se han evaluado diversas variables epidemiológicas, clínicas y bioquímicas incluidas pruebas de estimulación para predecir la remisión y evolución clínica de pacientes con EC con resultados contradictorios [35, 104].

* **MARCADORES MOLECULARES:** La expresión de CRHR1 en los ACTHomas es variable y no se han observado diferencias según el tamaño tumoral [105]. Además, como se ha comentado con anterioridad, en los ACTHoma, se ha descrito una expresión patológica de GHSR1a, lo que explica las respuestas especialmente altas de ACTH y cortisol a la ghrelina en pacientes con EC [7]. También se ha descrito que la expresión de In1-ghrelina y GHSR1b se sobreexpresan en diferentes tumores hipofisarios, incluidos ACTHomas, jugando un papel fisiopatológico en este tipo de tumor [106]. En los ACTHomas, se ha observado una expresión diferencial de SSTs, en concreto, un predominio en la expresión de SST₅ y niveles relativamente bajos de SST₂ [14]. Con respecto a los DR, el DRD2 es el que se expresa predominantemente en los ACTHomas [18]. Por otra parte, entre los marcadores de proliferación, varios estudios clínicos han descrito la asociación entre MKI67 y las características clínicas de los tumores hipofisarios, incluidas las características de invasión, el tamaño del tumor, el riesgo de recidiva y la tasa de crecimiento, pero éstos resultados son contradictorios [107]. En ACTHomas, MKI67 parece estar aumentado en macroadenomas, y se relaciona con una menor tasa de remisión a largo plazo [108-111]. Por su parte, PTTG1 se ha asociado con una mayor capacidad de invasión de los tumores hipofisarios [112]. Además, debemos mencionar que AVPR1b se sobreexpresa en ACTHomas, donde podría ejercer un papel funcional importante, pues sus niveles están directamente correlacionados con niveles elevados de ACTH plasmática en pacientes con EC, y podría ser un factor responsable de la estimulación directa de desmopresina en pacientes con EC [113]. De todos estos marcadores moleculares, ninguno de ellos se han identificado hasta la fecha como predictor de la evolución clínica a largo plazo y la remisión de los pacientes con EC después de la

cirugía transesfenoidal a diferencia de otros tumores hipofisarios, en los que los niveles de expresión de algunos elementos de estos sistemas reguladores se han asociado con el tamaño del tumor, la predicción del comportamiento y la respuesta al tratamiento con SSA de primera generación o DA [114-120]. Recientemente, se ha sugerido que pacientes con mutación en el gen USP8 podrían presentar mayor riesgo de recidiva de EC [121].

En este contexto, **actualmente no disponemos de marcadores clínicos, bioquímicos o moleculares que nos permitan predecir de forma fiable la evolución de pacientes con EC operados, con el objetivo de poder personalizar su seguimiento a largo plazo.** Dada la alta incidencia de recidiva, en la actualidad, el seguimiento clínico y bioquímico se recomienda de por vida, individualizando la periodicidad en cada caso [22, 56, 122].

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Por todo lo expuesto anteriormente, el **objetivo principal** de la presente Tesis Doctoral ha sido determinar si el estudio de los marcadores moleculares de los ACTHoma, sus características clínicas y sus parámetros bioquímicos-radiológicos, de forma individual o combinada, pueden ayudar a predecir la remisión o recidiva de la EC en pacientes tratados con cirugía. En el presente estudio, también se pretendió evaluar como **objetivo secundario** si las características clínicas y/o los parámetros bioquímicos-radiológicos al diagnóstico de la EC pueden predecir la expresión molecular a nivel tumoral.

Para llevar a cabo estos objetivos principal y secundario, se establecieron cuatro **objetivos específicos (OE)**:

- **OE1)** Determinar si el estudio de marcadores moleculares (receptores, genes y marcadores de proliferación) de los ACTHoma puede predecir la remisión o recidiva de la EC en pacientes tratados con cirugía.
- **OE2)** Determinar si la clínica de la EC y los parámetros bioquímicos-radiológicos pueden predecir la remisión o recidiva de la EC en pacientes tratados con cirugía.
- **OE3)** Determinar si una combinación de marcadores moleculares de ACTHoma y parámetros clínicos y bioquímicos-radiológicos puede predecir la remisión o recidiva de la EC en pacientes tratados con cirugía.
- **OE4)** Determinar si las características clínicas y/o los parámetros bioquímicos-radiológicos al diagnóstico de la EC pueden predecir la expresión molecular a nivel tumoral.

Para llevar a cabo el presente estudio, se diseñó y llevó a cabo un **estudio observacional retrospectivo multicéntrico**, en el que se incluyeron **60 pacientes**

diagnosticados de EC (88,3 % mujeres) procedentes de 6 Hospitales Universitarios a nivel nacional, tratados quirúrgicamente, y bien caracterizados desde el punto de vista clínico (datos demográficos, bioquímicos, radiológicos, y patológicos), en los que se disponía de una pieza tumoral tras la cirugía en la que se realizó el estudio molecular del tumor.

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3. PACIENTES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio observacional retrospectivo multicéntrico. Participaron diferentes hospitales de España: Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba), Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla), Hospital Universitario de la Rivera (Alzira, Valencia), Hospital Universitario y Politécnico de la Fe (Valencia), Hospital Universitario de Albacete (Albacete) y Hospital General Universitario de Alicante. Este estudio se realizó de acuerdo con los estándares éticos de la Declaración de Helsinki y con la aprobación de los Comités de Ética de todos los hospitales involucrados en el estudio. Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente.

3.1. Pacientes

Se incluyeron pacientes diagnosticados de EC, tratados con cirugía transesfenoidal entre 2004 y 2018, en los que se realizó el estudio molecular de la pieza quirúrgica y con un seguimiento mínimo de dos años. Se analizaron las variables clínicas, bioquímicas y radiológicas de estos pacientes al diagnóstico y durante el seguimiento, además de los marcadores moleculares de la pieza quirúrgica de ACTHoma (incluida la expresión de componentes del sistema de somatostatina, ghrelina y dopamina).

Teniendo esto en cuenta, se revisaron las historias clínicas de cada paciente al diagnóstico y durante el seguimiento tras tratamiento quirúrgico, recogiendo las siguientes variables:

- **Características clínicas:** plétora facial, cara de luna llena, lipomatosis cervical, estrías rojizas, grasa supraclavicular, acné, hirsutismo, fragilidad capilar, atrofia cutánea y muscular, edemas en miembros inferiores, astenia, labilidad emocional incluyendo la depresión, alteraciones menstruales, obesidad central, DM-2, HTA, dislipemia, osteoporosis, infecciones y ACV. También se recogieron el peso, talla y tensión arterial.
- **Determinaciones bioquímicas:** cortisol plasmático basal, CLU 24h, CS, cortisol plasmático nocturno (CPN), cortisol tras supresión con DXT, ACTH, PRL, TSH, GH, IGF-1, glucosa, iones y perfil lipídico.

- **Pruebas radiológicas:** características del adenoma en RM hipofisaria o TAC hipofisaria y resultados del cateterismo de senos petrosos.

La respuesta clínica y el seguimiento a largo plazo en pacientes con EC se evaluaron por remisión después de la cirugía y la presencia de recidiva durante el seguimiento. La remisión se definió como la normalización del CLU 24 h, el CS y el cortisol tras 1 mg de DXT en aquellos pacientes que no presentaron insuficiencia suprarrenal después de la cirugía. La insuficiencia suprarrenal se definió como cortisol basal menor de 5 µg/dL, realizado inmediatamente después de la cirugía y al mes después de la cirugía. La recidiva de EC se definió como la reaparición de las características clínicas y bioquímicas del hipercortisolismo después de la remisión inicial: niveles elevados de CLU 24h (1,6 veces el nivel superior de la normalidad) y/o niveles superiores de CS (puntos de corte: 0,27 µg/dL) y/o falta de inhibición del cortisol plasmático después de 1 mg de DXT (punto de corte: > 1,8 µg/dL) [22, 101]. Se analizaron los niveles de cortisol tras 1 mg de DXT al mes de la cirugía en todos los pacientes que no presentaron hipocortisolismo tras la cirugía.

Los pacientes fueron tratados de acuerdo con las guías clínicas disponibles [35, 36, 53, 123]. Se realizó cirugía transesfenoideal en todos los pacientes.

3.2. Muestras de adenomas corticotropos

Los ACTHoma fueron extraídos mediante resección quirúrgica por vía transesfenoidal. Tras la cirugía, se siguieron los protocolos estandarizados en los diferentes hospitales que participaron en este estudio, para obtener muestras de tumores inmediatamente después de la cirugía. Las muestras se mantuvieron en solución salina tamponada con fosfato para su examen y procesamiento inmediatos por parte de un patólogo experimentado. Específicamente, el patólogo conservó un fragmento para análisis anatomopatológicos y otro fragmento fue rápidamente transferido y almacenado en el reactivo ARN-later que es una solución utilizada para la estabilización y el almacenamiento del ARN. Las muestras se enviaron inmediatamente al laboratorio del grupo “Hormonas y Cáncer” del IMIBIC en Córdoba, donde se realizó

la extracción de ARN (en un plazo máximo de 24 horas) y se comprobó analizó la integridad del ARN utilizando un Bioanalizador. El ARN se almacenó congelado a -80°C hasta los análisis de retrotranscripción y qPCR, según el procedimiento descrito en otras publicaciones [113, 124]. Para asegurarse de que los tejidos del tumor hipofisario no estuvieran contaminados por tejidos hipofisarios normales, el fenotipo de las muestras hipofisarias recolectadas siempre se confirmó mediante tres métodos separados publicados previamente [113]. Estos métodos han sido: examen histológico por un anatomopatólogo experto, cribado molecular mediante PCR cuantitativa en tiempo real (que incluye la expresión de todos los tipos de hormonas hipofisarias) y, siempre que fue posible, comprobando el fenotipo hormonal usando secreción unicelular. Por tanto, en este estudio hemos confirmado que todas las muestras analizadas eran ACTHoma.

3.3. Aislamiento de ARN, transcripción inversa y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Los fragmentos de tejido hipofisario congelados se procesaron para la extracción de ARN total, posterior transcripción inversa y qPCR, utilizando para ello el kit Absolutely RNA Miniprep (Stratagene, Madrid, España), de acuerdo con un procedimiento ya descrito [125, 126]. El ARN total se cuantificó mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EEUU) y se retrotranscribió a ADN-copia (ADNc) utilizando el kit Revert Aid First Strand cDNA synthesis (MRE Fermentas, Hanover, MD, EEUU) siguiendo el manual del fabricante.

Específicamente, se analizaron en este estudio los genes de los componentes claves en la regulación del eje HHS, expresado como número absoluto de copias de ARNm/50 ng de muestra:

- **Receptores:** somatostatina (SST_1 , SST_2 , SST_3 , SST_5 , y sus variantes truncadas SST_5TMD5 y SST_5TMD4), dopamina ($DR1$, $DR2T$, $DR2L$, $DRD4$, $DR5$), ghrelina ($GHSR1a$ y variante truncada de $GHSR1b$), $CRHR1$ y $AVPR1b$.

- **Hormonas/enzimas:** POMC, ghrelina, variante truncada In1- ghrelina y GOAT.
- **Marcadores de proliferación:** PTTG1 y MKI67.

Se evaluó la estabilidad de la expresión de tres genes de referencia en todas las muestras utilizando RefFinder, una herramienta que integra los principales programas computacionales [127]: β -actina (ACTB), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT1) y gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH). Así se determinó que HPRT1 era el más estable. Por lo tanto, para medir los valores de expresión de los genes de interés se tomaron como referencia los niveles de HPRT1.

3.4. Determinación de variables bioquímicas.

La medición de los niveles de cortisol, ACTH, prolactina y TSH se realizó en los servicios de laboratorio de los diferentes hospitales involucrados utilizando diferentes ensayos y siguiendo las instrucciones del fabricante [106, 114, 128-132]. Los parámetros bioquímicos recogidos en este trabajo carecen de sesgo atribuible a la variabilidad interensayo (intralaboratorio/interlaboratorio) dentro/entre los diferentes hospitales. Todos los ensayos se realizaron bajo el mismo programa de control de calidad que consiste en un control de calidad interno y un control de calidad externo según las indicaciones de la IFCC (Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio) y la AACC (Asociación Americana de Química Clínica).

3.5. Análisis estadístico.

Para el análisis descriptivo de variables cualitativas se emplearon las frecuencias absolutas y el porcentaje para cada categoría. Las variables cuantitativas se expresaron con su mediana (\pm rango intercuartílico/rango mínimo-máximo) y su media (\pm desviación estándar). Se comprobó la normalidad de estas mediante el test de Shapiro-Wilk. Las pruebas de U-Mann Whitney se utilizaron para evaluar las asociaciones clínico-moleculares de las muestras de ACTHoma. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado para comparar variables cualitativas. Las pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA se usaron para comparaciones múltiples. Se realizaron análisis de regresión logística binomial univariante y multivariable para evaluar los parámetros que pudieran predecir la

remisión o recidiva de la EC tras la cirugía. La curva característica operativa del receptor (ROC) se utilizó para evaluar la precisión discriminante de los modelos de regresión logística binomial entre pacientes con EC en remisión y con EC persistente. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS v20 y GraphPad Prism v7. Los gráficos y tablas incluyen datos expresados como mediana \pm rango intercuartílico, el rango mínimo y máximo se indicó en las tablas para delinear la distribución de cada parámetro y las proporciones se expresaron como porcentajes. En todos los análisis, los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características basales

Incluimos en este estudio 60 pacientes con EC. El periodo de seguimiento medio fue de 24 – 152 meses tras la cirugía. El 88 % fueron mujeres y la edad media al diagnóstico fue de 40 años (15-78). El índice de masa corporal (IMC) fue 31.22 ± 12.75 kg/m² (20.58 – 50.77). Sólo 4 pacientes presentaron EC cíclica (6,7%). El tiempo referido desde la aparición de los síntomas hasta el diagnóstico fue de 24 ± 35 (1 – 120) meses. La clínica y comorbilidades presentes al diagnóstico de EC se resumen en la **tabla 6**, donde se muestra la frecuencia con la que se recoge cada signo y síntoma clínico en las historias clínicas de los pacientes, y porcentaje de aparición de cada uno de ellos. La mayoría de los casos se presentaron con obesidad central, plétora facial, cara de luna llena, astenia y labilidad emocional (más del 80 %). También fue frecuente el hirsutismo y la atrofia muscular (79,4 y 78,8 % respectivamente). La comorbilidad más prevalente fue la hipertensión arterial (50 %).

Las características bioquímicas y de imagen al diagnóstico se muestran en la **tabla 7**. En concreto, al diagnóstico, presentaron determinación patológica de cortisol tras 1 mg de DXT el 96,2%, CS el 92%, CLU 24h el 85,5% y CPN el 95,5% de los pacientes a los que se les realizaron estas determinaciones. En todos los pacientes se realizó RM hipofisaria con contraste salvo en una paciente portadora de marcapasos, a la que se realizó TAC hipofisario con contraste. En el estudio de imagen, 34 pacientes (56,7 %) presentaban microadenomas [mediana \pm RI: macroadenomas ($17 \pm 8,5$ mm), microadenomas ($6 \pm 1,6$ mm)].

Clínica	n (%)
Obesidad central	42 (85,7)
Plétora facial	39 (88,6)
Atrofia cutánea	20 (74,1)
Cara de luna llena	39 (88,6)
Lipomatosis cervical	33 (78,6)
Grasa supraclavicular	29 (78,4)
Hirsutismo	27 (79,4)
Atrofia muscular	26 (78,8)
Amenorrea	11 (50)
Estrías rojizas	27 (60)
Fragilidad capilar	16 (59,3)
Acné	12 (70,6)
Edemas en miembro inferiores	7 (36,8)
Cefalea	7 (12,7)
Astenia	28 (87,5)
Labilidad emocional	19 (82,6)
Alteración visual	3 (5,5)
Hipertensión arterial	30 (50)
Dislipemia	13 (21,7)
Diabetes tipo 2	17 (28,3)
Osteoporosis	12 (44,4)
Fracturas atípicas	5 (8,5)
Depresión	11 (25)
Psicosis	2 (3,3)
Infecciones	2 (3,4)
Enfermedades cardiovasculares	4 (6,7)
Enfermedades autoinmunes	8 (13,8)
Gastritis ulcerosa	3 (5,1)

Tabla 6. Clínica al diagnóstico de la enfermedad de Cushing.

Determinaciones	Mediana ± Rango intercuartil	Rango
Cortisol basal (µg/dL)	23 ± 8,2	7,9 – 71,90
Cortisol tras 1 mg de DXT (µg/dL)	12,64 ± 14,34	0,34 – 41
Cortisol plasmático nocturno (µg/dL)	12,60 ± 9,52	3,55 – 74
Cortisol salival nocturno (µg/dL)	0,66 ± 1,36	0,02 – 30
Cortisol libre urinario (µg/24h)	316 ± 380,88	21,90 – 3729,15
Cortisol tras 2 mg de DXT (µg/dL)	11 ± 11,89	2,6 – 46,5
Cortisol tras 8 mg de DXT (µg/dL)	4,2 ± 4,5	0,44 – 37,5
ACTH (pg/mL)	74.48 ± 64.80	12 – 281
Tamaño del tumor (mm)	8 ± 10	3 – 35

Tabla 7. Características bioquímicas y de imagen al diagnóstico.

Se realizó cateterismo de senos petrosos tras estimulación con desmopresina en 21 pacientes (35%), en 5 pacientes no se detectó lesión en la prueba de imagen. En todos ellos el gradiente de ACTH senos petrosos/periférico confirmó el diagnóstico de EC.

El tratamiento médico prequirúrgico para controlar el hipercortisolismo se realizó en 49 pacientes (81,7%). En todos los casos se indicó ketoconazol en monoterapia y se alcanzó el control bioquímico en el 67,5% de los casos, sin efectos adversos que obligaran a suspender el tratamiento. Los 60 pacientes se intervinieron mediante abordaje transesfenoidal. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el tratamiento quirúrgico fue de 162 ± 199 días (21 – 780).

4.2. Estudio molecular del tumor productor de ACTH.

Se estudió el perfil de expresión de los componentes clave del eje hipotálamo-pituitario-corticotropo en la pieza quirúrgica de los ACTHoma. El análisis de la expresión de los receptores de somatostatina (incluidas las variantes truncadas de SST₅ [12, 133]) reveló que SST₅ es el subtipo de receptor expresado de forma predominante en muestras de ACTHoma, seguido de SST₁ >> SST₂ > SST₃ > SST₅TMD5 > SST₅TMD4 (**Figura 4A**). El receptor más expresado del sistema dopaminérgico fue DRD2, seguido de DRD4 >> DRD5 > DRD1 (**Figura 4B**). En el caso del sistema ghrelina,

los componentes dominantes de este sistema fueron los receptores (GHRS1b \geq GHRS1a), seguidos de la enzima GOAT \geq In1-variante ghrelina > ghrelina nativa (**Figura 4C**). Como era de esperar, POMC, AVPR1b y CRHR1 se expresaron en gran medida en las muestras de ACTHoma (**Figura 4D**). También encontramos que los niveles de expresión del marcador de proliferación PTTG1 eran significativamente más altos que los niveles de MKI67 (**Figura 4D**). Los datos específicos sobre la media, los valores medianos y el número de copias de todos estos componentes se presentan en la **tabla 8**.

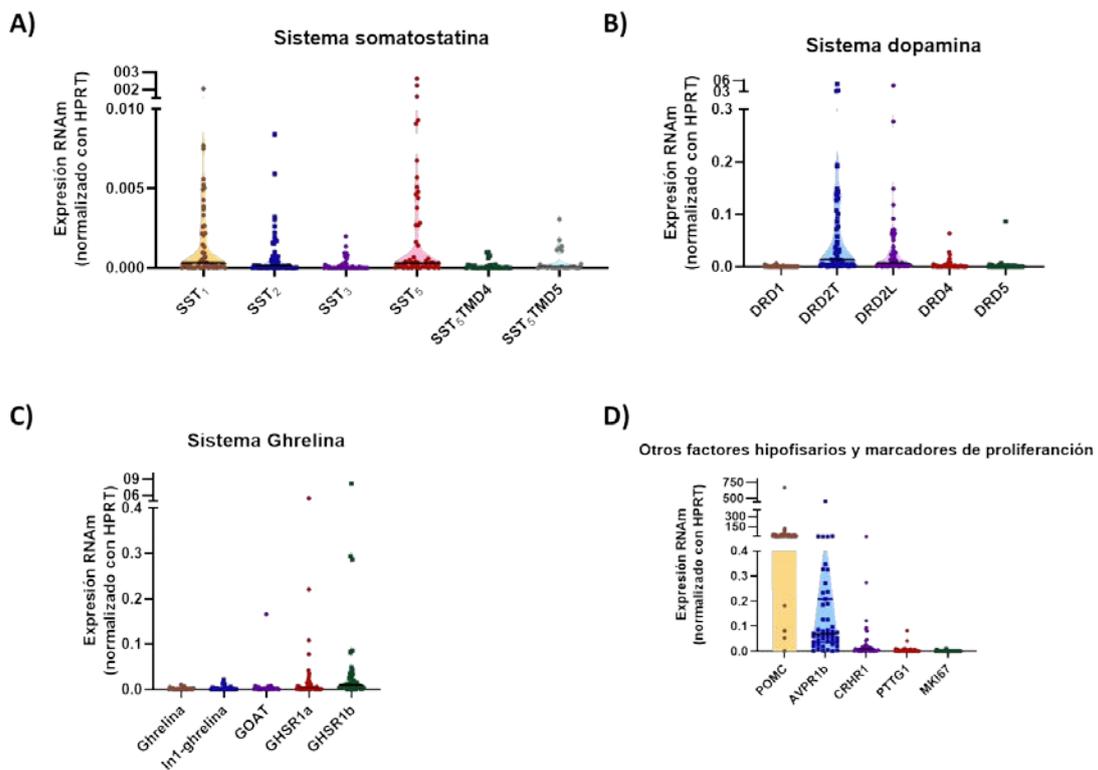


Figura 4. Expresión molecular de genes clave pertenecientes al eje hipotalámico-pituitario-corticotrófico en tumores hipofisarios secretores de ACTH. Perfil molecular (determinado por PCR cuantitativa en tiempo real) de los componentes de los sistemas de somatostatina (A), dopamina (B) y ghrelina (C), y de otros factores hipofisarios y marcadores de proliferación (D). Los datos representan la mediana (rango intercuartílico) de los niveles de expresión absolutos (número de copias) de cada gen ajustado por los niveles de expresión de un gen de normalización (HPRT1: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa).

Genes	Media (ntercuar ajustada por <i>HPRT1</i>)	Desviación estándar	Mediana	Rango intercuartílico	Mediana (Copias absolutas)	Rango intercuatílico (Copias absolutas)
Sistema somatostatina						
<i>SST₁</i>	0.002234710	0.0039768320	0.000346871	0.0025976	173.0000000	1210.4518500
<i>SST₂</i>	0.000696237	0.0014877565	0.000132143	0.0006000	36.1789998	234.6497722
<i>SST₃</i>	0.000418274	0.0015531438	0.000014889	0.0002161	8.6799150	108.9247931
<i>SST₅</i>	0.002884206	0.0055790453	0.000320700	0.0031991	277.3605966	1296.3762641
<i>SST₅TMD4</i>	0.000522460	0.0020671759	0.000013486	0.0001425	0.9638189	2.7367966
<i>SST₅TMD5</i>	0.000428528	0.0007871667	0.000070197	0.0002348	13.7016684	34.2536609
Sistema dopamina						
<i>DRD1</i>	0.000551259	0.0012078699	0.000129700	0.0003570	52.8326456	187.6719355
<i>DRD2T</i>	0.062021342	0.0977909960	0.014053300	0.0827404	7203.4971054	29237.2500000
<i>DRD2L</i>	0.037396858	0.0789131214	0.007240050	0.0348484	4967.0000000	18417.2318062
<i>DRD4</i>	0.004117211	0.0104576025	0.000386118	0.0021666	395.2930699	1225.8158330
<i>DRD5</i>	0.002560361	0.0121480878	0.000078600	0.0015905	34.0000000	232.6104310
Sistema ghrelina						
<i>Ghrelin</i>	0.001857498	0.0024392482	0.000885424	0.0028158	179.3477548	1044.9301084
<i>In1-ghrelin</i>	0.003328037	0.0053056947	0.001053802	0.0026413	294.2220229	1162.7826621
<i>GOAT</i>	0.008328582	0.0310858262	0.001764087	0.0031246	302.0000000	1042.2899119
<i>GHSR1a</i>	0.025077865	0.0833311375	0.003107500	0.0113351	1777.5805846	5192.5141466
<i>GHSR1b</i>	0.060843283	0.1544334057	0.010793864	0.0291807	1786.2491401	9146.5645756
Componentes clave adicionales						
<i>POMC</i>	30.806237371	95.5219747019	8.832880750	23.2779683	4185619.8081321	11906561.8634179
<i>AVPR1b</i>	10.123398985	67.0894232747	0.070053200	0.1612756	48849.6247700	145112.0000000
<i>CRHR1</i>	0.039053414	0.1057577414	0.009406200	0.0163959	7683.8356852	31949.0000000
Genes proliferación						
<i>PTTG1</i>	0.005695715	0.0134177207	0.001386069	0.0047626	1121.0000000	3213.9594181
<i>MKI67</i>	0.000750431	0.0020368822	0.000124932	0.0003522	97.3785692	635.5759745

Tabla 8. Expresión molecular de los componentes reguladores clave del eje hipotálamo-pituitario-corticotrópico, incluidos receptores, hormonas/enzimas y marcadores de proliferación en tumores hipofisarios secretores de ACTH. *HPRT1* usado como gen de normalización); IC: rango intercuartílico.

4.3. Resultados poscirugía transesfenoidal.

Los 60 pacientes se intervinieron mediante abordaje transesfenoidal, presentando complicaciones posquirúrgicas 12 de ellos (20%): 10 diabetes insípida transitoria, 1 meningitis y 1 insuficiencia cardiaca descompensada.

En las 24 – 48 horas tras la cirugía, la mediana de cortisol fue de $4,47 \pm 10,96$ $\mu\text{g/dL}$ (0,17 – 63). El 41,7% de los pacientes presentaron niveles de cortisol menor de 2 $\mu\text{g/dL}$ y el 52,1% menor de 5 $\mu\text{g/dL}$ en el postoperatorio inmediato.

Las determinaciones bioquímicas posquirúrgicas se muestran en la **tabla 9**.

Determinaciones	Mediana \pm Rango intercuartil	Rango
Cortisol basal poscirugía($\mu\text{g/dL}$)	$4,47 \pm 10,96$	0,17 – 63
Cortisol basal al mes poscirugía($\mu\text{g/dL}$)	$7 \pm 11,70$	0,65 – 32,92
Cortisol salival nocturno ($\mu\text{g/dL}$)	$0,21 \pm 0,20$	0,05 – 0,50
Cortisol libre urinario ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	$44,90 \pm 88,56$	0 – 848
ACTH (pg/mL)	$22,19 \pm 44,60$	1 – 133

Tabla 9. Determinaciones bioquímicas al mes posquirúrgico.

Al mes, sólo el 25,6% mantenía niveles de cortisol menores de 2 $\mu\text{g/dL}$. De todos los pacientes, el 41% mantenía niveles de cortisol entre 2 y 5 $\mu\text{g/dL}$. 9 pacientes precisaron tratamiento sustitutivo con hidrocortisona por insuficiencia suprarrenal secundaria, 7 presentaron hipotiroidismo secundario y 4 hipogonadismo hipogonadotropo. Tras la cirugía, sólo una paciente presentó los tres déficits.

Tras la cirugía, persistía la EC en 15 pacientes. La mediana de los niveles de cortisol basal poscirugía en estos pacientes fue de $18,81 \pm 13,50$ $\mu\text{g/dL}$ (4,5 – 63). Sólo un caso de persistencia presentó cortisol posquirúrgico inferior a 5 $\mu\text{g/dL}$. El nivel de ACTH tras la cirugía fue de $48,80 \pm 63,80$ pg/mL (20,60 – 106). El cortisol tras 1 mg de DXT fue de $8,91 \pm 7,14$ $\mu\text{g/dL}$ (3,32 – 15), presentando todos los pacientes esta prueba en rango

patológico. Los niveles de CLU 24h fueron de $75,43 \pm 164,93 \mu\text{g}/24\text{h}$ (13,2 – 848) y sólo en 3 pacientes estaba elevado. En 2 casos se había realizado la determinación de CS, siendo de 0,27 y 0,33 $\mu\text{g}/\text{dL}$, ambas elevadas.

En la **tabla 10** se comparan los parámetros bioquímicos y el tamaño tumoral, según los pacientes presentaron remisión o persistencia de EC tras la cirugía. Los signos, síntomas y comorbilidades basales fueron similares en pacientes con o sin remisión de EC (**tabla 11**).

	Total (n = 60)	Remisión (n = 45)	No remisión (n = 15)	p	Recidiva (n = 12)	No recidiva (n = 33)	p
VARIABLES RADIOLÓGICAS							
Tamaño del tumor (mm)	8 ± 10 (3 – 35)	8 ± 37.5 (3 – 35)	25 ± 17 (5 – 35)	0.006	7 ± 6.50 (4 – 17)	6.5 ± 4.75 (3 – 35)	0.831
Macroadenoma/Microadenoma	26 (43.3 %) / 34 (56.7 %)	10 (27.8 %) / 26 (72.2 %)	9 (81.8 %) / 2 (18.2 %)	0.002	3 (30 %) / 7 (70 %)	7 (26.9 %) / 19 (73.1 %)	1
VARIABLES BIOQUÍMICAS							
Cortisol tras 1 mg de dexametasona (µg/dL)	12.64 ± 14.34 (0.34 – 41)	13.30 ± 14.70 (0.34 – 41)	11.82 ± 13.10 (4 – 27.60)	0.670	18.50 ± 14.10 (0.34 – 41)	12.30 ± 14.85 (0.36 – 41)	0.149
Cortisol basal (µg/dL)	23 ± 8.2 (7.9 -71.90)	23.05 ± 7.43 (10.40 – 71.90)	21.30 ± 14.21 (7.90 – 41)	0.561	23 ± 6.89 (10.87 – 71.90)	23.10 ± 9.53 (10.40 – 41)	0.851
Cortisol plasmático nocturno (µg/dL)	12.60 ± 9.52 (3.55 – 74)	12.80 ± 9.52 (3.55 – 23)	12.40 ± 50.70 (8.30 – 74)	0.522	11.10 ± 15.40 (3.55 – 74)	14.20 ± 11.10 (3.55 – 23)	0.877
Cortisol salival nocturno (µg/dL)	0.66 ± 1.36 (0.02 – 30)	0.80 ± 1.53 (0.02 – 30)	0.80 ± 1.53 (0.42 – 1.75)	0.394	0.20 ± 0.11 (0.12 – 0.27)	0.85 ± 1.74 (0.02 – 30)	0.046
Cortisol libre en orina de 24h (µg/24 h)	316 ± 380.88 (21.90 – 3729.15)	313 ± 380.56 (21.90 – 3729.15)	277.42 ± 190.41 (32.40 – 597.60)	0.075	452 ± 400.85 (161 – 1403.85)	317.45 ± 426.40 (21.90 – 3729.15)	0.482
ACTH (pg/mL)	74.48 ± 64.80 (12 – 281)	78.75 ± 69 (12 – 281)	47.40 ± 68.80 (22 – 265.10)	0.461	77.24 ± 71.85 (31.80 – 281)	78.75 ± 67.45 (12 – 179)	0.813

Tabla 10. Características radiológicas y bioquímicas al diagnóstico de la enfermedad de Cushing. Comparación por grupos según remisión, y recidiva después de la primera cirugía.

Los pacientes que alcanzaron la remisión después de la primera cirugía presentaron menor tamaño del tumor al diagnóstico, menores niveles de cortisol sérico basal y de CLU 24h tras la cirugía, así como un cortisol tras supresión con 1 mg de DXT normalizado un mes después de la intervención (**Figura 5A**). Además, los pacientes en remisión también tenían mayor nivel de PRL tras la cirugía (**Figura 5A**). Con respecto a la clínica, los pacientes en remisión presentaron mayor incidencia de fragilidad capilar y labilidad emocional al diagnóstico, pero la incidencia de comorbilidades fue similar en ambos grupos de pacientes (**Tabla 11**). El tratamiento prequirúrgico de la EC no influyó en la remisión o persistencia de la EC tras la cirugía.

De los 45 pacientes en remisión tras la cirugía, 12 presentaron recidiva de EC durante el seguimiento. Los pacientes que recidivaron presentaron CS más bajos en el momento del diagnóstico, niveles séricos de TSH más bajos y un tiempo más corto desde el diagnóstico hasta la primera cirugía (**Figura 5B; Tabla 10 y Tabla 11**). Los signos, síntomas y comorbilidades basales fueron similares en pacientes con o sin recidiva (**Tabla 11**).

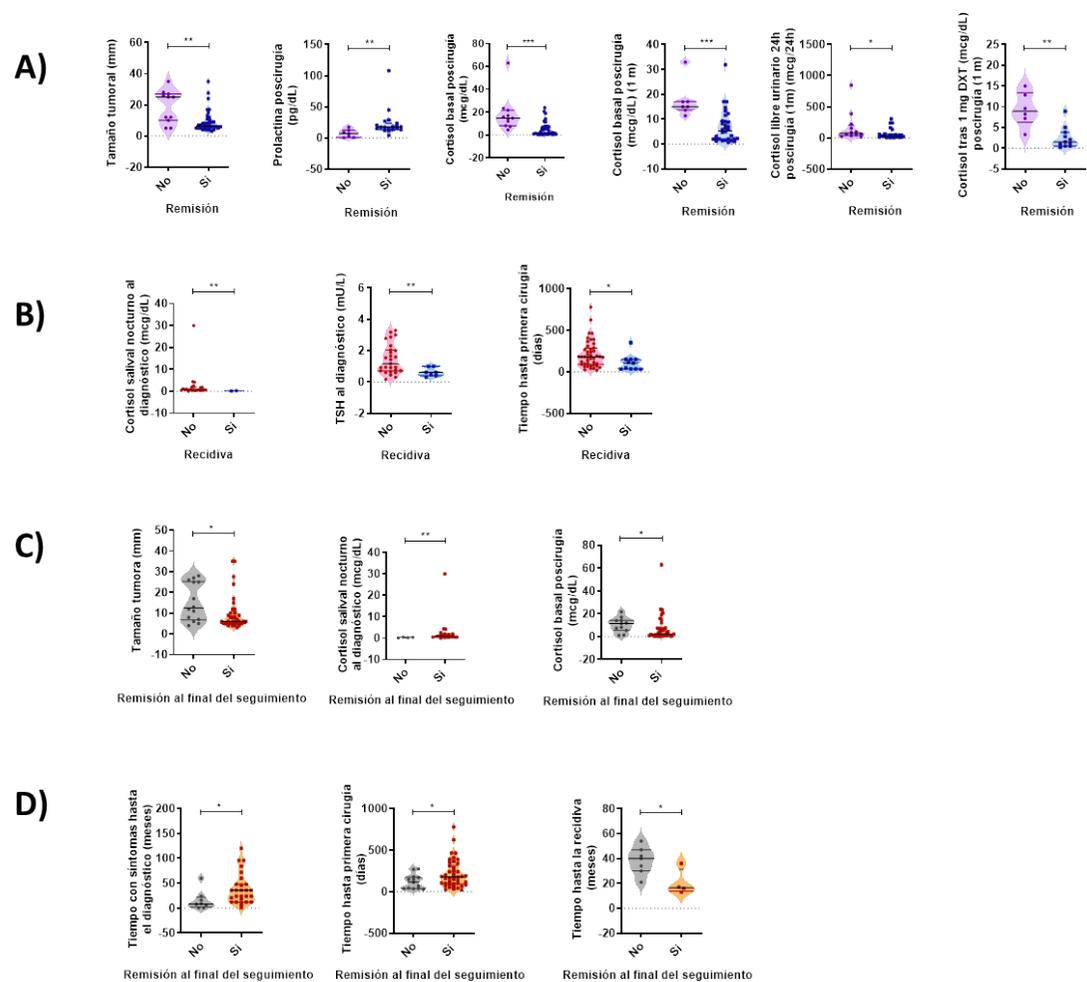


Figura 5. Asociaciones clínicas y bioquímicas en pacientes con tumores hipofisarios secretores de ACTH para predecir: A) remisión después de la primera cirugía, B) recidiva, C) remisión al final del seguimiento. Los datos representan la mediana (rango intercuartílico) de cada parámetro analizado. Los asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) indican diferencias significativas entre los grupos.

El tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica hasta el diagnóstico de recidiva fue 34 ± 25 meses (13 – 54). En todos los casos, la determinación de cortisol tras 1 mg de DXT fue la primera prueba en mostrarse patológica. El tratamiento de la recidiva fue reintervención quirúrgica en 8 casos (66,7%) y tratamiento médico en el resto. De los pacientes intervenidos, 3 presentaron remisión de la EC tras la segunda cirugía hasta la última visita de seguimiento, 4 recibieron tratamiento con REF y 1 RCE. De los 5 que recibieron radioterapia (REF y RCE), sólo 2 alcanzaron la remisión de la EC al final del seguimiento, ambos tratados con REF. Los pacientes que no se curaron tras cirugía y radioterapia, estaban en tratamiento en monoterapia con ketoconazol en 2 casos y en otro, terapia combinada con ketoconazol y cabergolina, presentando control clínico y bioquímico de la EC al final del seguimiento. Los tratamientos médicos prescritos en los 4 pacientes no intervenidos tras el diagnóstico de recidiva fueron: tratamiento combinado de cabergolina más pasireotida (1), monoterapia con cabergolina (1), monoterapia con pasireotida (1) y monoterapia con ketoconazol (1).

Sólo en uno de los casos reintervenidos podemos comparar el estudio molecular del primer adenoma con el de la reintervención (**Tabla 12**). Se puede apreciar que existen diferencias cuantitativas en los niveles de expresión de los receptores que se observan en dos muestras distintas de un mismo paciente. Concretamente, la expresión de SST₁, SST₂ y DRD2T fue mayor en la muestra inicial, mientras que por el contrario la expresión de SST₅ y DRD4 fue llamativamente mayor en la muestra obtenida tras la recidiva. El único receptor cuya expresión no varió entre la muestra inicial y en la muestra obtenida tras la recidiva del tumor fue el DRD1.

CARACTERISTICAS CLINICAS	Total (n = 60)	Remisión (n = 45)	No Remisión (n = 15)	p	Recidiva (n = 12)	No recidiva (n = 33)	p
Sexo (♂/♀)	7 (11.7 %) / 53 (88.3 %)	2 (4.4 %) / 43 (95.6 %)	5 (33.3 %) / 10 (66.7 %)	0.008	0/12 (100 %)	2 (6.1 %)/ 31 (93.9 %)	1
Edad al diagnóstico (años)	40 ± 19 (15 – 78)	40 ± 17 (15 – 78)	44 ± 25 (24 – 68)	0.463	36 ± 21 (15 – 65)	40 ± 23 (17-78)	0.310
IMC (Kg/m ²)	31.22 ± 12.75 (20.58 – 50.77)	31.05 ± 10.66 (20.58 – 50.77)	32.64 ± 16.30 (22.67 -49)	0.671	28.93 ± 9.81 (23.09 – 39.96)	31.22 ± 11.55 (20.58 – 50.77)	0.445
Enfermedad de Cushing cíclica	4 (6.7 %)	4 (8.9 %)	0	0.564	0	21 (91.3 %)	0.561
SIGNOS Y SINTOMAS							
Obesidad central	42 (85.7 %)	30 (81.1 %)	12 (100 %)	0.171	9 (81.8 %)	21 (80.8 %)	1
Plétora facial	39 (88.6 %)	32 (94.1 %)	7 (70 %)	0.069	11 (100 %)	3 (75 %)	1
Atrofia cutánea	20 (74.1 %)	14 (73.7 %)	6 (75 %)	1	8 (88.9 %)	6 (60 %)	0.303
Cara de luna llena	39 (88.6 %)	31 (91.2 %)	8 (80 %)	0.317	11 (100 %)	20 (87 %)	0.535
Lipomatosis cervical	33 (78.6 %)	27 (84.4 %)	6 (60 %)	0.181	8 (80 %)	16 (86.4 %)	0.637
Grasa supraclavicular	29 (78.4 %)	22 (81.5 %)	7 (70 %)	0.655	8 (88.9 %)	14 (77.8 %)	0.636
Hirsutismo	27 (79.4 %)	21 (87.5 %)	6 (60 %)	0.157	7 (100 %)	14 (82.4 %)	0.530
Atrofia muscular	26 (78.8 %)	19 (86.4 %)	7 (63.6 %)	0.186	6 (100 %)	13 (81.3 %)	0.532
Amenorrea	11 (50 %)	9 (60 %)	2 (28.6 %)	0.361	3 (75 %)	6 (54.5 %)	0.604
Estrías rojizas abdominales	27 (60 %)	21 (61.8 %)	6 (54.5 %)	0.732	8 (88.9 %)	13 (52 %)	0.107
Fragilidad capilar	16 (59.3 %)	14 (73.7 %)	2 (25 %)	0.033	7 (100 %)	7 (58.3 %)	0.106
Acné	12 (70.6 %)	9 (81.8 %)	3 (50 %)	0.28	4 (100 %)	5 (71.4 %)	0.491
Edema miembros inferiores	7 (36.8 %)	4 (33.3 %)	3 (42.9 %)	1	3 (60 %)	1 (14.3 %)	0.222
Cefalea	7 (12.7 %)	3 (7.3 %)	4 (28.6 %)	0.061	0	3 (10.3 %)	0.543
Astenia	28 (87.5 %)	21 (87.5 %)	7 (87.5 %)	1	5 (83.3 %)	16 (88.9 %)	1
Defectos visuales	3 (5.5 %)	1 (2.4 %)	2 (14.3 %)	0.156	0	1 (3.4 %)	1
Labilidad emocional	19 (82.6 %)	17 (94.4 %)	2 (40 %)	0.021	6 (100 %)	11 (91.7 %)	1
Depresión	11 (25 %)	10 (30.3 %)	1 (9.1 %)	0.241	1 (14.4 %)	9 (34.6 %)	0.397
Psicosis	2 (3.3 %)	2 (4.4 %)	0	1	0	2 (6.1 %)	1

COMORBILIDADES							
Hipertensión arterial	30 (50 %)	19 (42.2 %)	11 (73.3 %)	0.072	4 (33.3 %)	15 (45.5 %)	0.517
Dislipemia	13 (21.7 %)	8 (17.8 %)	5 (3.33 %)	0.279	3 (25 %)	5 (15.2 %)	0.661
Diabetes tipo 2	17 (28.3 %)	10 (22.2 %)	7 (46.7 %)	0.064	2 (16.7 %)	8 (24.2 %)	0.226
Osteoporosis	12 (44.4 %)	11 (47.8 %)	1 (25 %)	0.605	1 (14.3 %)	10 (62.5 %)	0.069
Fracturas atípicas	5 (8.5 %)	5 (11.4 %)	0	0.315	1 (9.1 %)	4 (12.1 %)	1
Infecciones	2 (3.4 %)	1 (2.2 %)	1 (7.1 %)	0.421	0	1 (3 %)	1
Enfermedad cardiovascular	4 (6.7 %)	2 (4.4 %)	2 (13.2 %)	0.258	0	3 (9.1 %)	1
Enfermedad autoinmune	8 (13.8 %)	5 (11.4 %)	3 (21.4 %)	0.385	1 (8.3 %)	4 (12.5 %)	1
Úlcera gástrica	3 (5.1 %)	2 (4.4 %)	1 (7.1 %)	0.564	0	2 (6.1 %)	1
Tiempo desde los síntomas hasta el diagnóstico (meses)	24 ± 35 (1 – 120)	24 ± 36 (1 – 120)	18 ± 41 (1 – 96)	0.292	18.50 ± 49 (1 – 72)	36 ± 35 (6 – 120)	0.463
Tiempo desde diagnóstico hasta cirugía (días)	162 ± 199 (21 – 780)	150 ± 219 (31 – 780)	182 ± 184.25 (21 – 339)	0.984	150 ± 189.5 (31 – 352)	178 ± 259 (40 – 780)	0.012

Tabla 11. Características clínicas al diagnóstico de la enfermedad de Cushing. Comparación por grupos según remisión y recidiva después de la primera cirugía.

Receptores	Muestra inicial	Muestra recidiva
SST ₁	0,000346	0,000145
SST ₂	0,000031	0,0000050
SST ₅	0,000267	0,014458
DRD1	0,000038	0,000036
DRD2T	0,044593	0,028516
DRD4	0,000022	0,010878

Tabla 12. Cuantificación de receptores en las dos muestras distintas, cirugía inicial y reintervención por recidiva de enfermedad de Cushing.

De los 15 casos en los que no se consiguió la remisión tras la primera cirugía, 6 pacientes se sometieron a una segunda intervención quirúrgica y, de estos, 2 entraron en remisión quedando con insuficiencia suprarrenal secundaria, en 2 se consiguió remisión sin insuficiencia suprarrenal secundaria y en el otro caso se decidió tratamiento posterior con REF. Este último caso no alcanzó remisión al final del seguimiento y precisó tratamiento con cabergolina. De los casos no intervenidos, 2 estaban en tratamiento con cabergolina en monoterapia (tratamiento indicado teniendo el perfil molecular del tumor), con un adecuado control clínico y bioquímico de la EC, y 7 casos recibieron REF. De los casos tratados con REF, sólo 2 alcanzaron remisión de EC. En los 5 casos en los que persistió la EC tras REF, en 2 se realizó adrenalectomía, y en 3 se indicó tratamiento médico (monoterapia con ketoconazol, monoterapia con cabergolina y monoterapia con temozolomida).

Al final del seguimiento, 17 pacientes presentaban insuficiencia suprarrenal secundaria en tratamiento sustitutivo con hidrocortisona. De estos, 14 presentaron remisión de EC desde la primera intervención, 1 alcanzó la remisión tras la segunda cirugía, y los otros 2 presentaron persistencia de EC, siendo necesaria adrenalectomía bilateral.

Durante el periodo de seguimiento, sólo se registró el fallecimiento de un paciente que presentó persistencia de EC tras la cirugía y precisó tratamiento con REF y adrenalectomía.

Los pacientes en remisión al final del seguimiento presentaron en el estudio inicial menor tamaño tumoral, mayor tiempo con síntomas hasta el diagnóstico, mayor tiempo hasta la primera cirugía, mayor cortisol salival nocturno pero menor cortisol basal postoperatorio y menor tiempo hasta la recidiva (**Figura 5C y Figura 5D**).

Al final del seguimiento, 16 pacientes presentaban persistencia de EC, y de estos, 14 (87,5%) mantenían un adecuado control del hipercortisolismo con tratamiento médico.

En los 44 pacientes que alcanzaron la remisión de EC, se produjo una reducción en la prevalencia de comorbilidades, excepto en la dislipemia, pero sin alcanzar una diferencia estadísticamente significativa (**Tabla 13**).

Clínica	Inicial	Tras remisión	p
Diabetes tipo 2	10 (22,7%)	5 (11,4%)	0,17
Hipertensión arterial	21 (47,7%)	13 (29,5%)	0,12
Dislipemia	7 (15,9%)	8 (18,2%)	1
Obesidad	18 (40,9%)	10 (22,7%)	0,11
Sobrepeso	10 (22,7%)	8 (18,2%)	0,79
Depresión	9 (20,5%)	7 (15,9%)	0,78
Osteoporosis	10 (22,7%)	7 (15,9%)	0,59

Tabla 13. Prevalencia de comorbilidades al diagnóstico y tras la remisión de la enfermedad de Cushing.

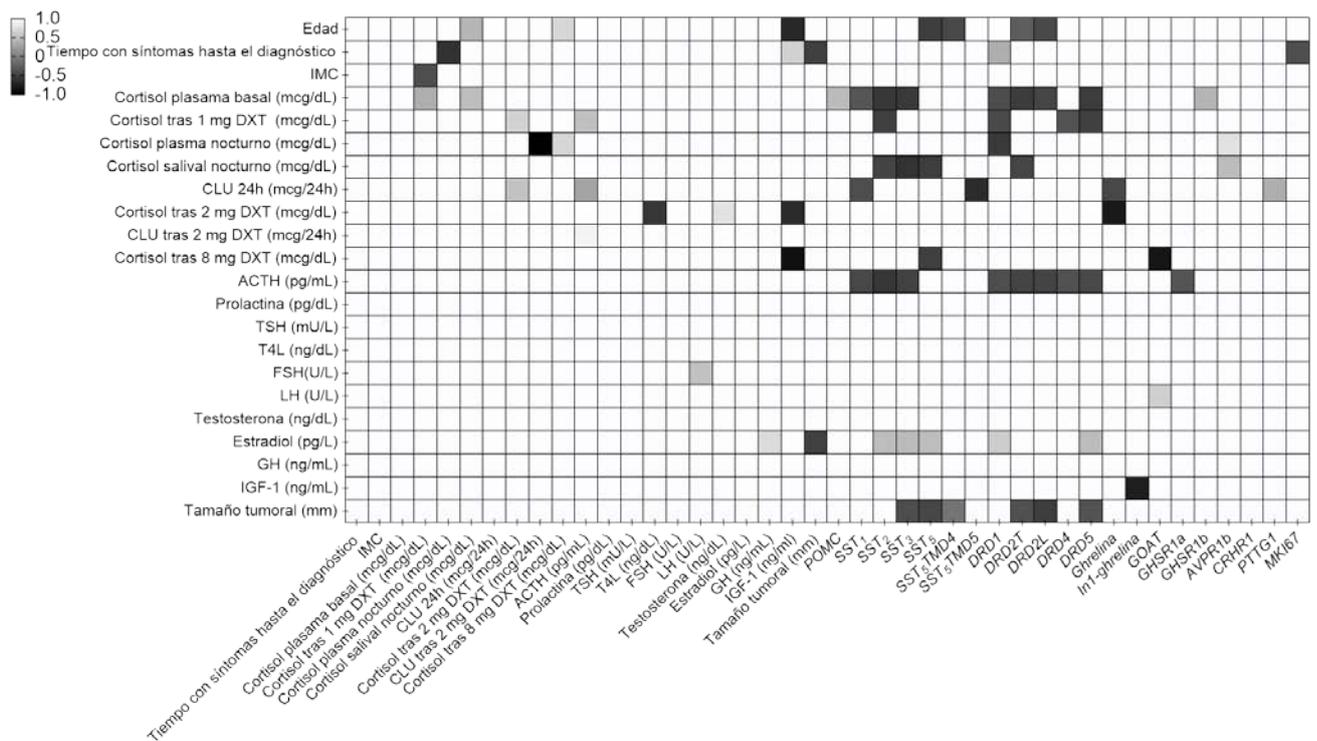
Tras remisión de EC, el 50% de los pacientes presentaron remisión de la DM-2 ($p=0,17$). La persistencia de la DM-2 en los pacientes en remisión, se asoció con un mayor nivel de Hemoglobina glicosilada (HbA1c) al diagnóstico ($9,07 \pm 0,94\%$ vs $5,61 \pm 0,32\%$; $p=0,004$) y una mayor expresión de ghrelina a nivel tumoral ($0,005 \pm 0,004$ copias vs $0,001 \pm 0,002$ copias; $p= 0,012$), sin observarse relación con ningún otro parámetro clínico, bioquímico ni molecular. La persistencia de otras comorbilidades como HTA, dislipemia, obesidad, sobrepeso, depresión u osteoporosis tras la remisión de EC, no se asoció con ningún parámetro clínico, bioquímico ni molecular.

4.4. Correlación entre los datos clínicos y expresión molecular

4.4.1. Análisis de correlaciones entre variables clínicas, bioquímicas y moleculares en pacientes con tumores hipofisarios secretores de ACTH.

En nuestra cohorte de pacientes con EC, detectamos que variables clínicas se correlacionaron con otras variables bioquímicas y moleculares (**Figura 6A**). Específicamente, la edad se correlacionó directamente con el CS y el cortisol tras 8 mg de DXT. Se detectó también una correlación inversa entre el valor de IGF1 al diagnóstico, y los niveles de expresión de SST₅, SST₅TMD4, DRD2T y DRD2L (**Figura 6A**). El cortisol basal al diagnóstico se correlacionó directamente con los niveles de expresión de POMC y GHSR1b, mientras que se detectó una correlación inversa con la expresión de SST₁, SST₂, SST₃, DRD1, DRD2T, DRD2L y DRD5. La ACTH al diagnóstico se correlacionó inversamente con la expresión de SST₁, SST₂, SST₃, DRD1, DRD2T, DRD2L, DRD4, DRD5 y GHSR1a (**Figura 6A**). Además, el cortisol basal y CS se correlacionaron directamente con la expresión de AVPR1b (**Figura 6A**).

A)



B)

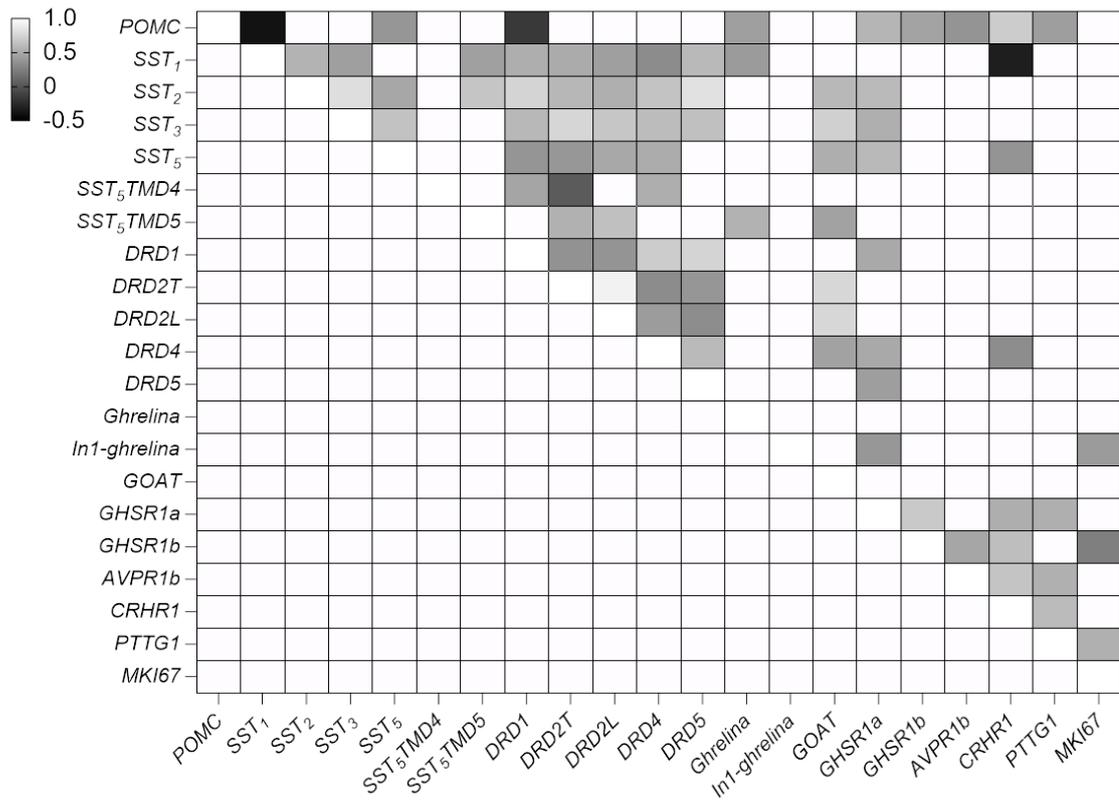


Figura 6. Correlaciones clínicas y moleculares en pacientes con tumores hipofisarios secretores de ACTH. A) Correlaciones entre variables clínicas, bioquímicas y moleculares. B) Correlaciones entre los niveles de expresión de todos los componentes moleculares medidos en tumores hipofisarios secretores de ACTH. La escala de grises corresponde al valor r de Pearson obtenido tras el análisis estadístico. El gris oscuro significa “correlaciones inversas” y el gris claro significa “correlaciones directas”.

La expresión de POMC se correlacionó inversamente con SST₁ y DRD1 y se correlacionó directamente con SST₅, ghrelina, GHSR1a, GHSR1b, AVPR1b, CRHR1 y PTTG1 (**Figura 6B**). La expresión de AVPR1b también se correlacionó directamente con PTTG1 y CRHR1 (**Figura 6B**). La expresión de CRHR1 se correlacionó directamente con POMC, SST₅, DRD4, GHSR1a, GHSR1b y AVPR1b, pero se correlacionó inversamente con SST₁ (**Figura 6B**). Además, los marcadores de proliferación PTTG1 y MKI67 se correlacionaron directamente entre ellos y con otros marcadores moleculares (**Figura 6B**). Específicamente, PTTG1 se correlacionó directamente con POMC, GHSR1a, AVPR1b y CRHR1, mientras que MKI67 se correlacionó directamente con In1-ghrelina y GHSR1b (**Figura 6B**).

4.4.2. Tamaño del tumor, los niveles de hormonas y el tiempo hasta el tratamiento se asociaron con la respuesta clínica y el seguimiento a largo plazo de pacientes con EC.

Como ya hemos descrito, en esta cohorte, la remisión después de la cirugía se alcanzó en 45 de 60 pacientes. De esos 45 pacientes en remisión, se confirmó recidiva en 12 pacientes (**Tabla 10 y 11**).

Los pacientes que alcanzaron la remisión después de la primera cirugía presentaron menor tamaño tumoral, mayor PRL basal y menor cortisol sérico basal posquirúrgico (**Figura 5A**). Además, los pacientes en remisión también tenían niveles más bajos de cortisol sérico basal y de CLU 24 h, así como normalización del cortisol tras 1 mg de DXT tras la cirugía (**Figura 5A**). Además, los pacientes en remisión presentaron mayor incidencia de fragilidad capilar y labilidad emocional, pero la incidencia de comorbilidades fue similar en ambos grupos de pacientes (**Tabla 11**).

Los pacientes con recidiva de la EC presentaron CS más bajo en el momento del diagnóstico, niveles séricos de TSH más bajos, y menos tiempo desde el diagnóstico hasta la primera cirugía (**Figura 5B**). Los signos, síntomas y comorbilidades basales fueron similares en pacientes con o sin recidiva (**Tabla 11**).

Finalmente, los pacientes en remisión al final del seguimiento, presentaron menor tamaño tumoral, mayor tiempo con síntomas hasta el diagnóstico, mayor tiempo hasta la primera cirugía, mayor CS, pero menor cortisol postoperatorio y menor tiempo hasta la recidiva (**Figuras 5C**).

4.4.3. Los niveles de expresión de algunos componentes del sistema de somatostatina y MKI67 se asociaron con la remisión después de la primera cirugía en tumores hipofisarios secretores de ACTH.

Los pacientes en remisión después de la primera cirugía tenían niveles de expresión de SST₁ más bajos en comparación con los pacientes en los que persistía la EC (**Figura 7A**). Los niveles de expresión de los otros subtipos de SSTs o de los componentes del sistema de dopamina y ghrelina no se asociaron con la remisión en esta cohorte (**Figuras 7A-C**). Curiosamente, se observó una mayor expresión de CRHR1 y MKI67 en pacientes en remisión (**Figura 7D**).

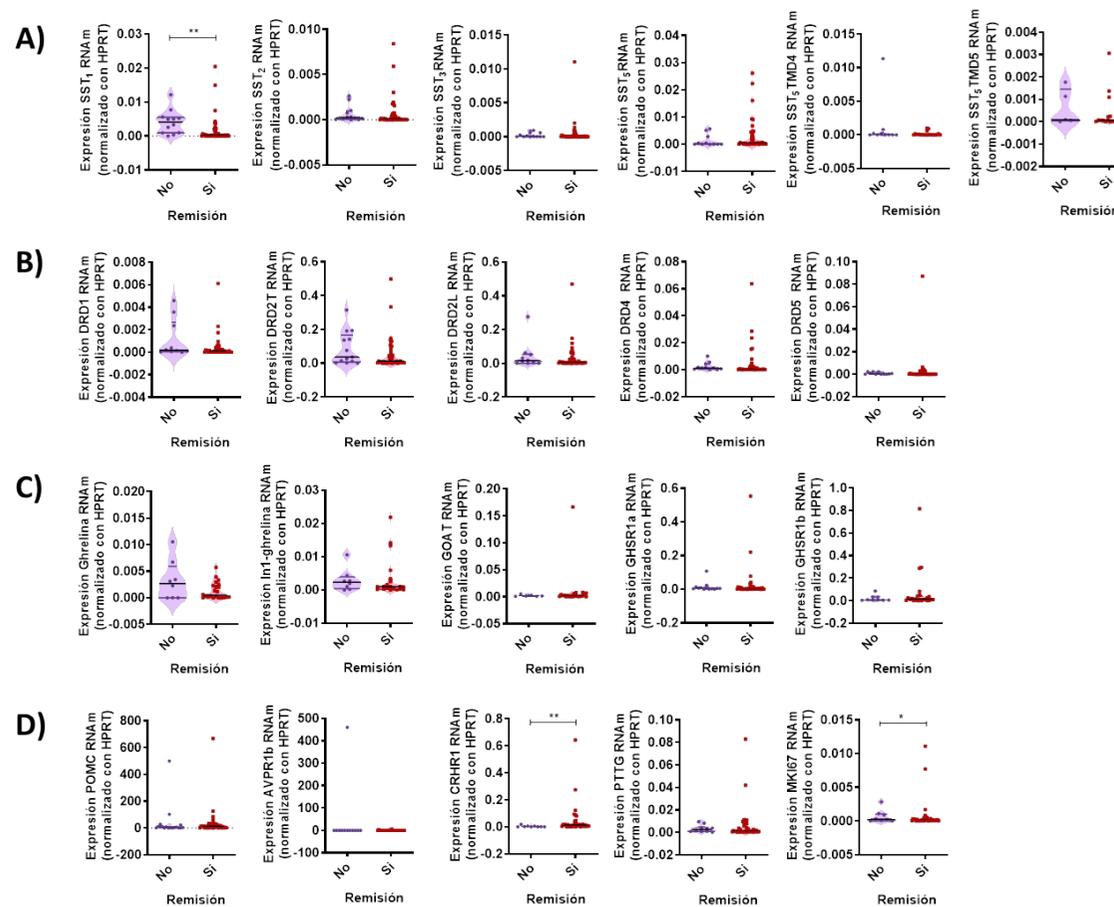


Figura 7. Expresión molecular en tumores hipofisarios secretores de ACTH de pacientes con y sin remisión. Perfil molecular (determinado por PCR cuantitativa en tiempo real) de los componentes de los sistemas de somatostatina (A), dopamina (B) y ghrelina (C), y de componentes hipofisarios claves y marcadores de proliferación (D). Los datos representan la mediana (rango intercuartílico) de los niveles de expresión absolutos (número de copias) de cada gen ajustado por los niveles de expresión de un gen de normalización (HPRT1). Los asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) indican diferencias significativas entre los grupos.

Finalmente, encontramos que el nivel de expresión de SST₅ aumentó en microadenomas en comparación con macroadenomas (**Figura 8**).

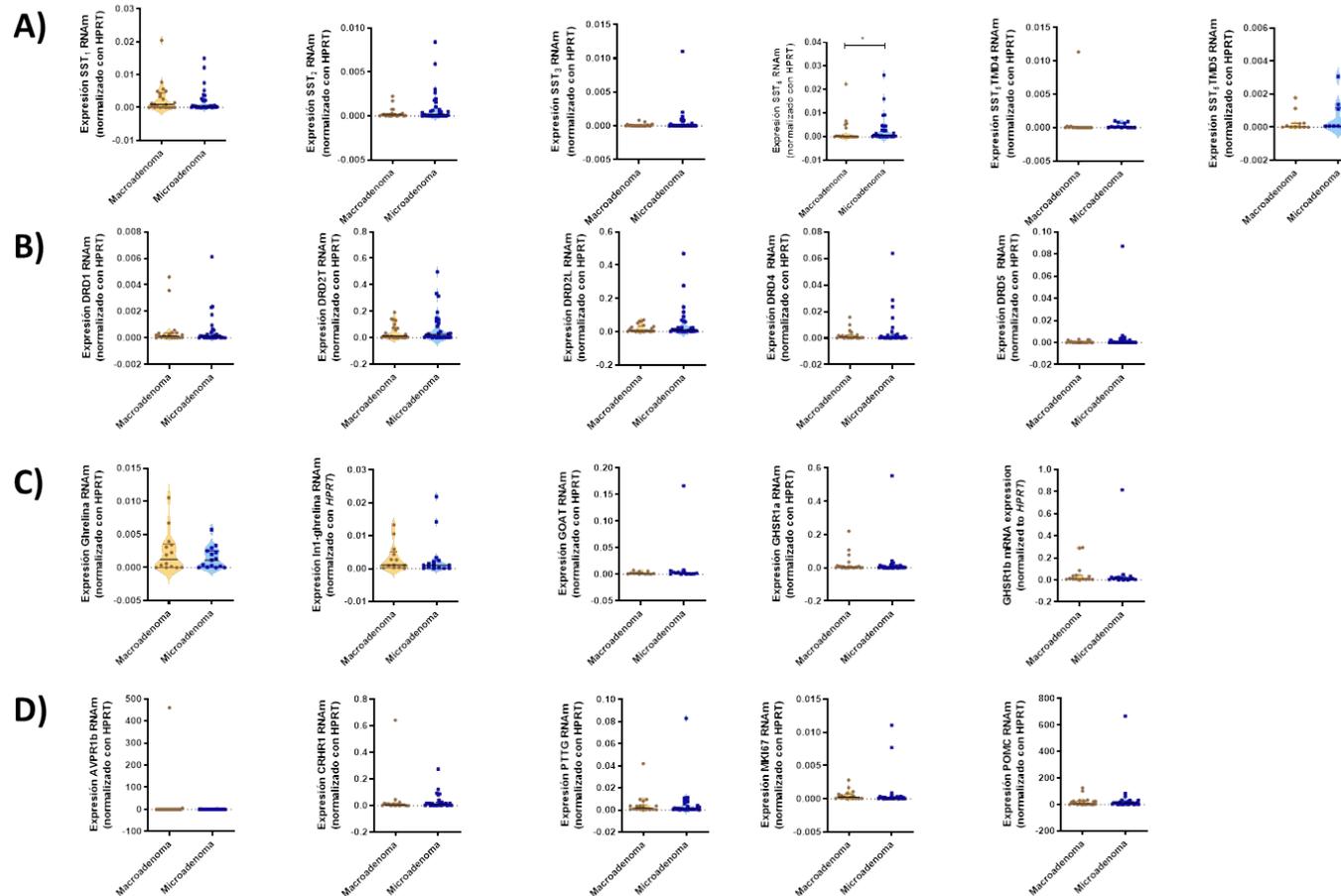


Figura 8. Expresión molecular en tumores hipofisarios secretores de ACTH de pacientes con micro o macroadenomas. Perfil molecular (determinado por PCR cuantitativa en tiempo real) de los componentes de los sistemas de somatostatina (A), dopamina (B) y ghrelina (C), y de componentes hipofisarios claves y marcadores de proliferación (D). Los datos representan la mediana (rango intercuartílico) de los niveles de expresión absolutos (número de copias) de cada gen ajustado por los niveles de expresión de un gen de normalización (HPRT1). El asterisco (* $p < 0,05$) indica diferencias significativas entre los grupos.

4.4.4. Los niveles de expresión de SST₁ están asociados con la recidiva de la enfermedad en tumores hipofisarios secretores de ACTH.

Los niveles de expresión de SST₁ fueron menores en los pacientes que presentaron recidiva durante el seguimiento (**Figura 9A**). Los niveles de expresión de los demás componentes moleculares analizados no se asociaron con la recidiva de EC en esta cohorte (**Figuras 9A-D**).

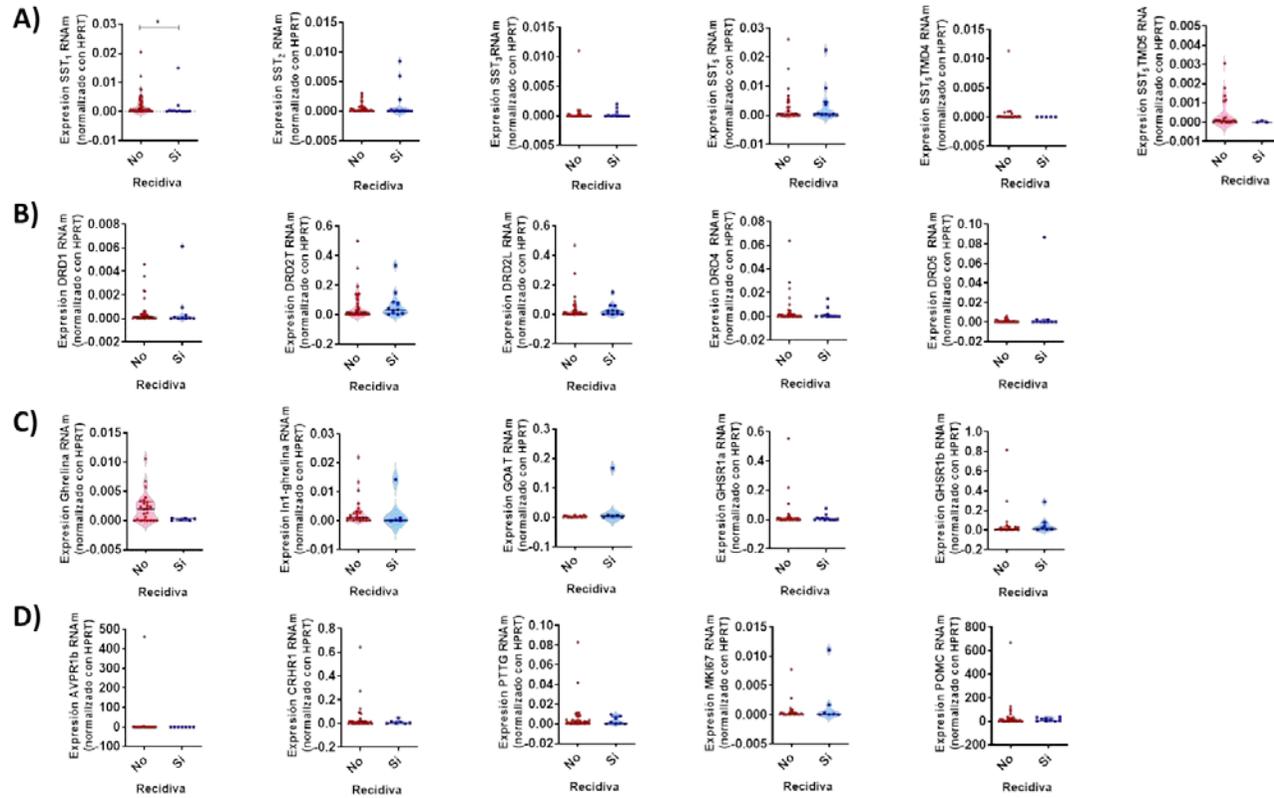


Figura 9. Expresión molecular en tumores hipofisarios secretores de ACTH de pacientes con y sin recidiva. Perfil molecular (determinado por PCR cuantitativa en tiempo real) de los componentes de los sistemas de somatostatina (A), dopamina (B) y ghrelina (C), y de otros componentes hipofisarios claves y marcadores de proliferación (D). Los datos representan la mediana (rango intercuartílico) de los niveles de expresión absolutos (número de copias) de cada gen ajustado por los niveles de expresión de un gen de normalización (HPRT1). El asterisco (* p < 0,05) indica diferencias significativas entre los grupos.

4.4.5. Una combinación de parámetros clínicos y moleculares puede predecir con precisión la remisión de los pacientes después de la primera cirugía.

Para explorar más a fondo la capacidad de los parámetros clínicos y moleculares analizados para la predicción del pronóstico de los pacientes con EC durante su seguimiento, es decir, remisión o recidiva de EC, se realizó un análisis de regresión logística binomial. Ningún parámetro clínico o molecular se asoció significativamente con la predicción de recidiva de los pacientes (**Tablas 14 y 15**).

Parámetros clínicos	P	Odds Ratio	95% C.I. Mín.	95% C.I. Max.
Tamaño tumoral (mm)	0.191	1.081	0.962	1.216
Prolactina basal posquirúrgica (pg/dL)	0.817	1.007	0.951	1.065
Cortisol basal posquirúrgico (µg/dL)	0.355	1.051	0.946	1.169
Cortisol basal al mes posquirúrgico (µg/dL)	0.322	1.064	0.941	1.201
Cortisol libre en orina de 24 horas al mes posquirúrgico (µg/dL)	0.234	1.008	0.995	1.022
Cortisol tras 1 mg dexametasona al mes posquirúrgico (µg/dL)	0.209	1.341	0.849	2.117
Cortisol salival nocturno basal (µg/dL)	0.099	3212.853	0.22	46979569.518
TSH al diagnóstico (mU/L)	0.069	9.733	0.837	113.109
Tiempo desde el diagnóstico hasta la cirugía (días)	0.056	1.008	1	1.016

Tabla 14. Regresiones logísticas binomiales con características clínicas que comparan pacientes con tumores hipofisarios secretores de ACTH con y sin recidiva.

Genes	<i>p</i>	Odds Ratio	95% C.I. Mín.	95% C.I. Max.
<i>SST</i> ₁	0.071	1.855	0.949	3.623
<i>SST</i> ₂	0.768	1.084	0.634	1.854
<i>SST</i> ₃	0.896	1.040	0.576	1.879
<i>SST</i> ₅	0.259	0.667	0.330	1.347
<i>SST</i> ₅ <i>TMD4</i>	0.541	1.546	0.383	6.236
<i>SST</i> ₅ <i>TMD5</i>	0.085	3.033	0.857	10.729
<i>DRD1</i>	0.669	1.219	0.492	3.020
<i>DRD2T</i>	0.379	0.691	0.303	1.575
<i>DRD2L</i>	0.311	0.623	0.249	1.557
<i>DRD4</i>	0.682	1.195	0.510	2.800
<i>DRD5</i>	0.839	1.057	0.618	1.807
Ghrelina	0.091	2.047	0.892	4.702
ln1-ghrelina	0.355	1.795	0.520	6.200
<i>GOAT</i>	0.176	0.321	0.062	1.665
<i>GHSR1a</i>	0.619	1.219	0.558	2.666
<i>GHSR1b</i>	0.169	0.401	0.109	1.475
<i>AVPR1b</i>	0.134	2.731	0.734	10.161
<i>CRHR1</i>	0.769	1.149	0.454	2.908
<i>PTTG1</i>	0.322	1.881	0.538	6.575
<i>MKI67</i>	0.786	0.863	0.300	2.487

Tabla 15. Regresiones logísticas binomiales con características moleculares comparando pacientes con tumores hipofisarios secretores de ACTH con y sin recidiva.

Por el contrario, varios parámetros clínicos y moleculares se asociaron significativamente con la remisión de los pacientes (**Tablas 16 y 17**). De hecho, el tamaño del tumor (OR: 1,124), la PRL basal posquirúrgica (OR: 0,762), el cortisol basal posquirúrgico (OR: 1,199), el CLU 24h al mes posquirúrgico (OR: 1,20) y el cortisol tras 1 mg DXT al mes posquirúrgico (OR: 1,741) se asociaron significativamente con la remisión de EC ($p < 0,05$ en todos los casos, **Tabla 16**). De manera similar, la expresión de *SST*₁ (OR: 3,052) y *CRHR1* (OR: 0,175) se asoció significativamente con la remisión del paciente con EC ($p < 0,05$ en ambos casos, **Tabla 17**).

Parámetros clínicos	p	Odds	95% C.I.	95% C.I.
		Ratio	Mín.	Max.
Tamaño tumoral (mm)	0.005	1.124	1.037	1.219
Prolactina basal posquirúrgica (pg/dL)	0.016	0.762	0.611	0.95
Cortisol basal posquirúrgico (µg/dL)	0.002	1.199	1.068	1.345
Cortisol basal al mes posquirúrgico (µg/dL)	0.017	1.2	1.033	1.393
Cortisol libre en orina de 24 horas al mes posquirúrgico (µg/dL)	0.113	1.005	0.999	1.012
Cortisol tras 1 mg dexametasona al mes posquirúrgico (µg/dL)	0.025	1.741	1.072	2.827
Cortisol salival nocturno basal (µg/dL)	0.429	0.591	0.16	2.178
TSH al diagnóstico (mU/L)	0.558	1.279	0.561	2.913
Tiempo desde el diagnóstico hasta la cirugía (días)	0.591	0.999	0.994	1.003

Tabla 16. Regresiones logísticas binomiales con características clínicas comparando pacientes con tumores hipofisarios secretores de ACTH con y sin remisión tras la primera cirugía.

Curiosamente, los análisis de regresión logística binomial ajustados revelaron que la combinación de parámetros clínicos y/o moleculares podía discriminar finalmente a los pacientes en remisión después de la primera cirugía (**Figura 10**). Concretamente, un modelo clínico que incluía las dos variables clínicas asociadas con la remisión con mayor significación (tamaño del tumor y el cortisol sérico posquirúrgico) generó una curva ROC con un AUC = 0,888 (modelo 1; $p < 0,001$; **Figura 10**), mientras que el modelo molecular generado con la expresión de SST₁ y CRHR1 resultó en una curva ROC con un AUC = 0,913 (modelo 2; $p < 0,001$; **Figura 10**). Finalmente, un modelo clínico-molecular que combina 2 parámetros clínicos y 2 moleculares generó una curva ROC impecable con un AUC de 1 (modelo 3; $p < 0,001$; **Figura 10**) para la predicción del pronóstico de remisión de pacientes con EC.

Genes	p	Odds Ratio	95% C.I. Mín.	95% C.I. Max.
<i>SST₁</i>	0.014	3.052	1.252	7.442
<i>SST₂</i>	0.182	1.505	0.826	2.743
<i>SST₃</i>	0.267	1.446	0.754	2.772
<i>SST₅</i>	0.451	0.781	0.411	1.484
<i>SST₅TMD4</i>	0.443	1.409	0.586	3.385
<i>SST₅TMD5</i>	0.225	1.873	0.680	5.164
<i>DRD1</i>	0.244	1.679	0.702	4.017
<i>DRD2T</i>	0.232	1.623	0.734	3.589
<i>DRD2L</i>	0.819	1.110	0.453	2.720
<i>DRD4</i>	0.584	1.251	0.561	2.791
<i>DRD5</i>	0.440	1.223	0.734	2.038
Ghrelina	0.777	1.115	0.526	2.365
In1-ghrelina	0.832	1.121	0.390	3.217
<i>GOAT</i>	0.783	0.795	0.155	4.070
<i>GHSR1a</i>	0.554	1.255	0.592	2.662
<i>GHSR1b</i>	0.910	0.953	0.414	2.192
<i>AVPR1b</i>	0.963	1.017	0.489	2.116
<i>CRHR1</i>	0.006	0.175	0.050	0.612
<i>PTTG1</i>	0.761	1.183	0.401	3.489
<i>MKI67</i>	0.923	0.951	0.346	2.613

Tabla 17. Regresiones logísticas binomiales con características moleculares comparando pacientes con tumores hipofisarios secretores de ACTH con y sin remisión tras la primera cirugía.

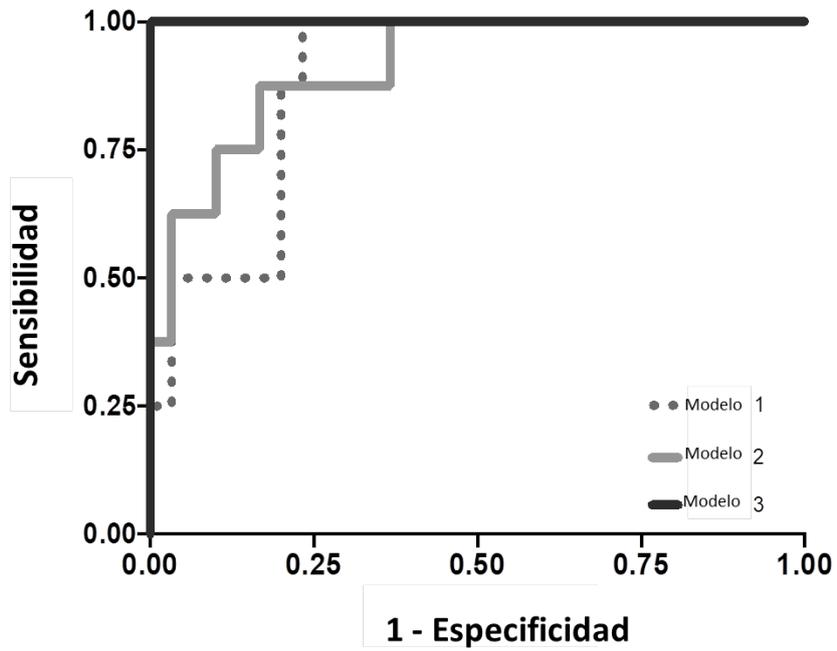


Figura 10. Análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC) de diferentes modelos clínico-moleculares para predecir la remisión en pacientes con tumores hipofisarios secretores de ACTH. Modelos clínicos que incluyen: las dos variables clínicas más significativamente asociadas a la remisión (tamaño del tumor y cortisol sérico posquirúrgico; modelo 1) y la expresión molecular de SST₁ y CRHR1 (modelo 2) o la combinación de las variables clínicas anteriores y marcadores moleculares (modelo 3).

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

La cirugía hipofisaria transesfenoidal es el tratamiento de elección de la mayoría de los pacientes con EC [22, 35, 53]. Sin embargo, la enfermedad persiste en alrededor del 20% de los pacientes intervenidos. En los pacientes que presentan remisión tras la cirugía, la recidiva ocurre en más de un 50% de los casos según las series publicadas [22, 53, 55-57]. Por este motivo, en la actualidad, se recomienda seguimiento de por vida en todos los pacientes con EC [22, 56, 122].

La predicción de la remisión y/o recidiva posquirúrgica de EC es un desafío en la práctica clínica, especialmente debido a las tasas variables de remisión y al alto riesgo de recidiva [94, 134]. Las tasas de remisión quirúrgica dependen del tamaño y la localización del tumor, de las habilidades y experiencia del neurocirujano y de los criterios bioquímicos utilizados para evaluar la remisión [53]. La recidiva a largo plazo es variable en la literatura, oscilando entre el 8% y el 66% [57]. Varias series con periodos de seguimiento prolongados de hasta 20 años, presentan tasas de recidiva de hasta el 36 %, con un tiempo medio hasta la recidiva de 15 a 50 meses [98, 135]. En nuestra cohorte, el tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica hasta el diagnóstico de recidiva fue 34 ± 25 meses. Sin embargo, las características clínicas preoperatorias como la edad, el sexo, la duración de la enfermedad y la gravedad de los signos y síntomas clínicos no permiten identificar a los pacientes con mayor riesgo de recidiva [21, 96, 104].

En este contexto, se diseñó el presente estudio observacional retrospectivo multicéntrico. El objetivo principal fue determinar si el estudio de los marcadores moleculares de los ACTHoma, las características clínicas y los parámetros bioquímicos-radiológicos, de forma individual o combinada, pueden predecir la remisión o recidiva de la EC y, además, determinar si las características clínicas y/o los parámetros bioquímicos-radiológicos al diagnóstico de la EC, pueden predecir la expresión molecular a nivel tumoral. Se incluyeron 60 pacientes diagnosticados de EC y tratados

quirúrgicamente de 6 hospitales de España, y en los que se realizó el estudio molecular del tumor en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) y el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Córdoba. Se identificaron variables clínicas, bioquímicas, radiológicas y moleculares que permiten predecir la remisión y/o recidiva posquirúrgica de EC. Específicamente, se han evaluado los niveles de expresión de genes de los componentes claves en la regulación del eje HHS, y se han explorado sus asociaciones con los diferentes parámetros clínicos, bioquímicos y radiológicos. Finalmente, se construyeron modelos de regresión logística basados en datos clínicos y moleculares para predecir la evolución a largo plazo de los pacientes con EC [136].

En este estudio, el 88 % de los pacientes incluidos fueron mujeres y la edad media al diagnóstico fue de 40 años, siendo estos datos concordantes con los descritos en la literatura. La presentación clínica del SC también fue similar a la comunicada en otras series, excepto el porcentaje de microadenomas que se comunicó en el 56,7 % de los casos [21, 22]. No hemos encontrado una explicación que justifique el mayor porcentaje de macroadenomas encontrado en nuestra serie.

El tratamiento médico preoperatorio se debe plantear en los pacientes con clínica grave secundaria al hipercortisolismo cuando el tiempo desde el diagnóstico hasta la cirugía se estime prolongado [59, 79]. En la actualidad, no existe evidencia que confirme la necesidad de tratamiento preoperatorio en otras circunstancias clínicas [22]. En nuestra serie, el tratamiento médico prequirúrgico para controlar el hipercortisolismo se realizó en 49 pacientes (81,7%), indicado por hipercortisolismo grave o por un tiempo prolongado hasta la cirugía. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el tratamiento quirúrgico fue de 162 ± 199 días (21 – 780). En todos los casos se indicó ketoconazol en monoterapia y se alcanzó el control bioquímico en el 67,5% de los casos, sin efectos adversos que obligaran a suspender el tratamiento. El uso ketoconazol prequirúrgico en nuestra serie es mayor que el reportado por otros autores, que lo indican hasta en un 20% de los pacientes con EC, especialmente en pacientes con hipercortisolismo severo o adenoma no visible [79]. Estudios retrospectivos informan que el tratamiento preoperatorio con inhibidores de la

esteroidogénesis, normaliza los niveles de cortisol en un 50 – 72%, con mejoría clínica en sólo un tercio de los pacientes [80, 81]. La recuperación del eje HHS en el periodo preoperatorio puede favorecer la aparición del hipocortisolismo posquirúrgico y este hecho dificulta valorar la remisión de la EC tras la cirugía [22]. En los resultados de nuestro estudio, el tratamiento médico prequirúrgico no influyó en la remisión o persistencia de la EC tras la cirugía.

En nuestra cohorte, la remisión posquirúrgica ocurrió en el 75% y la recidiva fue de un 26% durante el seguimiento [136]. Estos resultados son similares a los comunicados por otros autores [55, 56, 100]. En la presente cohorte, el tamaño del tumor < 1 mm (microadenoma) se asoció con la remisión de EC después de la primera cirugía y también al final del seguimiento [136]. Esto es consistente con una gran serie de 230 pacientes con ACTHoma, en los que el tamaño del tumor se consideró como el único predictor de resultado positivo en estos pacientes [137]. Además, el mayor tamaño del tumor (macroadenomas), la invasión de las estructuras vecinas y los factores histológicos agresivos se han correlacionado con mayores tasas de recidiva. Por el contrario, un menor tamaño del tumor y una mayor experiencia del neurocirujano se han asociado con menores tasas de recidiva [21, 138, 139]. Sin embargo, estos hallazgos no fueron apoyados por los resultados de un metaanálisis que concluyó que el tamaño del tumor y la invasión macroscópica no eran predictores de recidiva [104].

La severidad bioquímica del hipercortisolismo, hasta donde conocemos, tampoco se ha relacionado con la remisión posquirúrgica, ni con la recidiva de la EC. En nuestra cohorte, los niveles séricos de ACTH antes de la cirugía no se relacionaron con la remisión o recidiva de la EC [136]. Sin embargo, niveles preoperatorios más altos de ACTH se han asociado con tasas de remisión bioquímica más bajas [57]. Además, los niveles séricos más altos de ACTH tras la cirugía se han correlacionan con una mayor incidencia de recidiva de EC, mientras que los niveles séricos bajos de ACTH se correlacionan con una remisión sostenida de la enfermedad [140, 141]. En varios estudios, los niveles de ACTH por debajo del límite de normalidad se han considerado

como un parámetro menos sensible para la remisión a largo plazo de la EC que el hipocortisolismo, pero más específico [98, 141]. Sin embargo, no se ha determinado un valor de corte de ACTH que pueda predecir la recidiva a largo plazo. Nuestros resultados, junto con los resultados publicados, no apoyan la utilidad de severidad bioquímica del hipercortisolismo como predictor de los resultados posoperatorios.

Por el contrario, como se observó en nuestra cohorte, una mayor duración del hipocortisolismo postoperatorio se ha descrito como un predictor importante de remisión [135, 136, 142]. Los resultados de varios estudios sugieren que la duración de la insuficiencia suprarrenal postoperatoria está inversamente correlacionada con el riesgo de recidiva [57]. De hecho, se han observado tasas de recidiva más bajas en pacientes con niveles de cortisol postoperatorios bajos, que en pacientes con niveles normales o elevados [97]. Basándose en estos estudios, una declaración de consenso recomienda la vigilancia mantenida de los pacientes con niveles persistentes de cortisol sérico superiores a 5 µg/dL y el seguimiento estrecho cuidadoso de aquellos pacientes con niveles de cortisol entre 2 y 5 µg/dL [143]. Sin embargo, es importante destacar que la recidiva de la EC aparece hasta, aproximadamente, en el 10 % de los pacientes con niveles de cortisol sérico postoperatorios bajos (< 2 µg/dL) o incluso indetectables [99]. No existe un valor de corte claro que excluya el riesgo de recidiva e, incluso, pacientes con cortisol sérico posoperatorio elevado alcanzan la remisión a largo plazo [21, 98]. Actualmente, se recomienda la determinación de CLU 24h en aquellos casos en los que los niveles de cortisol en plasma no sean concluyentes. En este sentido, son sugestivos de remisión posquirúrgica los niveles de CLU 24h inferiores a 20 µg/24h, valores elevados sugieren persistencia de EC y niveles normales de CLU 24h no son concluyentes [57, 98]. Los niveles de CS no han sido suficientemente validados como predictor de recidiva [21]. En nuestra cohorte, sólo el cortisol basal postoperatorio se asoció con la remisión posquirúrgica, así como al final del seguimiento, lo que refuerza el potencial pronóstico de este parámetro [21, 94, 136].

Entre los parámetros clínicos, el tamaño del tumor y el cortisol basal posquirúrgico presentaron las asociaciones más significativas con la remisión de los pacientes con EC después del tratamiento quirúrgico (AUC = 0,888; $p < 0,001$) [136]. Los pacientes que alcanzaron la remisión después de la primera cirugía presentaron menor tamaño tumoral, menor cortisol sérico basal posquirúrgico y mayor prolactina basal tras la cirugía [136]. Aunque en los resultados de este trabajo ningún parámetro clínico o molecular mostró predicción de la recidiva de la EC [136], se han utilizado algoritmos de aprendizaje automático para predecir la recidiva de EC al año de la cirugía [144]. En este estudio, los niveles de cortisol basal posoperatorio y los niveles de ACTH posoperatorios y preoperatorios se asociaron significativamente con la recidiva [144]. Además, tras utilizar un algoritmo de bosque aleatorio, la edad, el cortisol basal posoperatorio y la ACTH posoperatoria se han considerado como las mejores variables predictoras de recidiva de EC durante el primer año después de la cirugía [144]. En otro estudio recientemente publicado, en el que también se utilizó un algoritmo de aprendizaje automático, los resultados sugieren que el sexo, la edad, la visualización del tumor en la RM hipofisaria, el tamaño tumoral < 10 mm, el grado de Hardy-Wilson y la confirmación histológica de la secreción de ACTH, el hipopituitarismo pre/posoperatorio y el tratamiento médico prequirúrgico, podrían tener un papel en la predicción de la remisión a largo plazo [145]. Por lo tanto, los resultados de nuestro trabajo [136], junto con la evidencia previa, sugieren que es posible definir modelos matemáticos basados en parámetros clínicos, especialmente el tamaño del tumor y el cortisol basal posquirúrgico, que pueden predecir la evolución a largo plazo de los pacientes con EC, aunque son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis. En la actualidad, no hay ningún trabajo en el que se relacionen los niveles de prolactina con el pronóstico de la EC tras el tratamiento quirúrgico. Los resultados obtenidos en nuestra cohorte, en los que los niveles de prolactina posquirúrgica eran más altos en los pacientes que alcanzan la remisión, deben de ser estudiados más a fondo.

En cuanto a la expresión molecular de genes claves del eje HHS en ACTHoma, se ha descrito que SST₅ es uno de los receptores de somatostatina que se expresa de

forma predominante en estos tumores, mientras que los niveles de SST₂ son más reducidos, debido a la modulación del cortisol [63, 146, 147]. En nuestra cohorte, se observó un patrón similar de expresión de SSTs [136], lo cual se considera una base para las terapias moleculares dirigidas en la EC [147]. Curiosamente, nuestros datos revelaron que SST₁ se expresa notablemente en ACTHoma, siendo sus niveles incluso superiores a los de SST₂. Sorprendentemente, observamos que la disminución de los niveles de expresión de SST₁ se asoció con la remisión posquirúrgica. Este inesperado hallazgo podría ser clínicamente relevante, ya que la expresión de SST₁ se ha descrito previamente en otros tumores, y se ha asociado con la proliferación y agresividad celular [148-151]. Estos resultados sugieren que los tratamientos farmacológicos dirigidos específicamente a SST₁ podrían ser una opción prometedora para el tratamiento de pacientes con ACTHomas.

En relación al sistema dopaminérgico, DRD2 fue el receptor dopaminérgico más expresado en nuestros pacientes [136], coincidiendo con resultados previamente publicados [152]. En este contexto, algunos autores han destacado que la expresión de DRD2 se correlaciona con la respuesta clínica a los agonistas dopaminérgicos de algunos tipos de tumores hipofisarios [153]. Sin embargo, nuestro estudio no mostró asociación entre la expresión de DRD y la evolución clínica, lo que es consistente con hallazgos publicados en tumores hipofisarios no funcionantes [154].

También se conoce, que la ghrelina estimula la secreción de ACTH y cortisol en condiciones normales, y esta regulación se acompaña de una retroalimentación negativa de los glucocorticoides. Este efecto estimulador persiste en pacientes con EC [155, 156], e incluso en pacientes con tumores ectópicos secretores de ACTH, en los que se ha descrito una hiperrespuesta de ACTH a la ghrelina [156]. En este contexto, también evaluamos en nuestra cohorte los niveles de expresión de algunos componentes del sistema de ghrelina. Específicamente, ghrelina y sus receptores (GHSR1a y GHSR1b) se correlacionaron con POMC [136], coincidiendo con resultados previamente publicados, que indican que ghrelina estimula las neuronas POMC a través de un mecanismo no identificado y estimula la secreción de ACTH en

ACTHomas [106, 156]. En esta línea, publicaciones previas han descrito un aumento de la expresión de la variante de truncada In1-ghrelina en tumores hipofisarios, que se asocia con características agresivas, y su silenciamiento se acompaña de una reducción de la proliferación celular en cultivos primarios hipofisarios [106]. En nuestra cohorte, la expresión de la variante In1-ghrelina se correlacionó directamente con MKI67 [136], lo que sugiere una asociación con marcadores de proliferación. Además, la enzima GOAT se correlacionó fuertemente con la expresión de receptores de somatostatina y dopamina, como SST₂, SST₅ y DRD2, resultados también comunicados en otros tumores neuroendocrinos [157]. Finalmente, el receptor truncado GHSR1b también presentó correlaciones significativas, incluso con CRHR1 y PTTG1, que deberían investigarse más a fondo [136]. Además, detectamos que los niveles de CRHR1 se asociaron significativamente con la remisión posquirúrgica [136].

En los últimos años, la evaluación sistemática de MKI67 en tumores hipofisarios ha sido objeto de debate [158]. Varios estudios clínicos han descrito la asociación entre MKI67 y las características clínicas de los tumores hipofisarios, incluidas las características de invasión, el tamaño del tumor, el riesgo de recidiva y la tasa de crecimiento, pero estos resultados son contradictorios [107]. En ACTHomas, MKI67 parece estar aumentado en macroadenomas, y se relaciona con una menor tasa de remisión a largo plazo [108-110]. Otro estudio ha sugerido que niveles de Ki67 superiores al 4 % (evaluados por inmunohistoquímica) y valores séricos de ACTH superiores a 40 ng/mL un mes después de la cirugía se asociaron con la ausencia de remisión en pacientes con EC [111]. En nuestra cohorte, la expresión de MKI67 no se asoció con remisión o recidiva de la EC, ni con el tamaño del tumor, pero se correlacionó con la expresión de In1-ghrelina y GHSR1b [136], y ambas variantes del sistema ghrelina se sobreexpresan en diferentes tumores hipofisarios, incluidos ACTHomas, jugando un papel fisiopatológico en este tipo de tumor hipofisario [106]. Se ha descrito que la variante truncada In1-ghrelina y su receptor GHSR1b pueden promover el desarrollo y progresión de ciertos cánceres relacionados con el sistema endocrino [9, 10]. Curiosamente, encontramos que los niveles de expresión de PTTG1 fueron significativamente más altos que MKI67 en ACTHomas. PTTG1 se ha asociado

con una mayor capacidad de invasión de los tumores hipofisarios [112] y, recientemente, se ha asociado con la invasividad, la edad y el género femenino en los tumores hipofisarios no funcionantes [159]. En nuestra cohorte, PTTG1 se correlacionó con la expresión de POMC, AVPR1b y CRHR1 [136]. Esta correlación podría ser fisiopatológicamente relevante, ya que se ha demostrado que AVPR1b se sobreexpresa en ACTHomas, donde podría ejercer un papel funcional importante, pues sus niveles están directamente correlacionados con niveles elevados de ACTH plasmática en pacientes con EC, y podría ser un factor responsable de la estimulación directa de desmopresina en pacientes con EC [113].

Finalmente, los estudios de regresión logarítmica binomial confirmaron los resultados observados en nuestra cohorte de pacientes con EC. Aunque no identificamos ningún parámetro clínico o molecular sólido que estuviera significativamente asociado con la predicción de recidiva de la EC, se identificaron algunos parámetros moleculares (SST_1 y CRHR1) y clínicos (tamaño del tumor y las determinaciones posquirúrgicas de cortisol basal, CLU 24h, cortisol tras 1 mg DXT y prolactina) que se asociaron significativamente con la remisión de los pacientes [136]. Además, demostramos que un modelo que combina las dos variables clínicas que se encontraron significativamente asociadas con la remisión, es decir, el tamaño del tumor y el cortisol basal después de la cirugía (modelo de predicción 1 en la **figura 10**), junto con los marcadores moleculares identificados, es decir, SST_1 y CRHR1 (modelo de predicción 2 en la **figura 10**) podría mejorar mejor la capacidad predictiva de ambos modelos individuales. Así pues, el análisis de la curva ROC, basado en el tamaño del tumor, el cortisol sérico postoperatorio y los niveles de expresión de SST_1 y CRHR1, podría discriminar perfectamente entre pacientes en remisión y persistencia de EC después de la primera cirugía (modelo predictivo 3: curva ROC con un AUC de 1 en la **figura 10**). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que muestra un algoritmo clínico-molecular capaz de identificar pacientes con EC con diferentes riesgos de presentar remisión o persistencia de EC después de la primera cirugía, resultados que podrían ser muy relevantes en la práctica clínica para plantear el seguimiento posquirúrgico a largo plazo de los pacientes con EC, que en la actualidad debe ser de

por vida [22, 56, 122]. En una revisión sistemática reciente publicada que incluyó a 630 pacientes con EC de cinco cohortes diferentes, se informó de que la probabilidad de remisión de EC era mayor en pacientes que presentaban mutación en el alelo somático USP8 [121]. En este sentido, sería interesante realizar en el futuro análisis multicéntricos para evaluar si el análisis del estado mutacional de USP8, junto con los parámetros moleculares y clínicos identificados en este estudio, es decir, la expresión de SST₁/CRHR1, tamaño tumoral y cortisol basal postoperatorio, podría predecir con precisión la remisión de los pacientes con EC después de la primera cirugía. Sin embargo, también debemos mencionar que una limitación de nuestro estudio podría ser que los niveles de ARNm no siempre se traducen directamente en niveles de proteína funcional, sin embargo, varios estudios que analizan la correspondencia entre el ARNm y el estado de la proteína, utilizando tecnologías transcriptómicas y proteómicas, han revelado que la abundancia de un ARNm suele ser un excelente indicador de la presencia de una proteína [160, 161].

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el análisis molecular de los ACTHoma podría ser una valiosa herramienta para mejorar la comprensión de la fisiopatología de los ACTHomas, y poder predecir la evolución posoperatoria de los pacientes con EC. Nuestros resultados muestran que, la expresión de dos determinantes moleculares, SST₁ y CRHR1, ayudaría a predecir, junto con el tamaño del tumor y el cortisol basal después de la cirugía, el comportamiento tumoral de los pacientes con EC [136].

Con respecto a la evolución clínica de los pacientes en remisión de la EC, en nuestra cohorte se observó una reducción de comorbilidades tales como DM-2, HTA, obesidad, sobrepeso, depresión u osteoporosis. Por el contrario, la persistencia de dislipemia aumentó ligeramente. Las diferencias en la persistencia de las comorbilidades tras la remisión de la EC no fueron estadísticamente significativas. La persistencia de las comorbilidades tras la remisión también ha sido comunicada por otros autores [30, 31]. La persistencia de DM-2 en nuestra cohorte se asoció a mayor nivel de HbA1c inicial, que podría estar en relación con una diabetes de mayor

evolución y probablemente de origen multifactorial, y no sólo en relación con el hipercortisolismo. La persistencia de DM-2 también se asoció a una mayor expresión de ghrelina a nivel tumoral; este hecho podría ser una base fisiopatológica en el desarrollo de la diabetes en los pacientes con EC. La persistencia de otras comorbilidades como HTA, dislipemia, obesidad, sobrepeso, depresión u osteoporosis tras la remisión de EC, no se asoció con ningún parámetro clínico, bioquímico ni molecular.

Por último, en nuestra cohorte, detectamos que variables clínicas y bioquímicas se correlacionaron con variables moleculares, y este hecho podría ayudar a predecir el perfil molecular del ACTHoma, y de esta manera, poder seleccionar un tratamiento médico más personalizado y eficaz en aquellos pacientes en los que no es posible el estudio del perfil molecular de ACTHoma. Concretamente, se detectó una correlación inversa entre el valor de IGF1 al diagnóstico y los niveles de expresión de SST₅, SST₅TMD4, DRD2T y DRD2L. Los niveles de cortisol basal al diagnóstico se correlacionaron directamente con los niveles de expresión de POMC y GHSR1b, mientras que se detectó una correlación inversa entre niveles de cortisol basal al diagnóstico y la expresión de SST₁, SST₂, SST₃, DRD1, DRD2T, DRD2L y DRD5. La ACTH al diagnóstico se correlacionó inversamente con la expresión de SST₁, SST₂, SST₃, DRD1, DRD2T, DRD2L, DRD4, DRD5 y GHSR1a. Además, el cortisol basal y CS se correlacionaron directamente con la expresión de AVPR1b [136]. Estos hallazgos presentan importancia y aplicabilidad en la práctica clínica, ya que sugieren, que en paciente con niveles elevados de cortisol basal y ACTH al diagnóstico, el tratamiento con cabergolina no debería ser una opción a tener en cuenta inicialmente, pues los niveles de DR se expresan poco en estos casos, y esto coincide con las recomendaciones actuales para el tratamiento de la EC [22].

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Las **principales conclusiones** asociadas a los objetivos de esta Tesis Doctoral se describen a continuación:

- Existen marcadores moleculares de los ACTHoma, concretamente SST₁ y CRHR1, que pueden predecir la remisión de la EC en pacientes tratados con cirugía.
- Existen parámetros clínicos, concretamente el tamaño del tumor y las determinaciones posquirúrgicas de cortisol basal, CLU 24h, cortisol tras 1 mg DXT y PRL, que pueden predecir la remisión de la EC en pacientes tratados con cirugía.
- El análisis combinado de dos marcadores moleculares de los ACTHoma (SST₁ y CRHR1) y dos parámetros clínicos (tamaño del tumor y el cortisol basal posquirúrgico) puede predecir con gran precisión la evolución clínica y la remisión de pacientes con EC tratados con cirugía.
- Existe una correlación entre las características clínicas y/o los parámetros bioquímicos-radiológicos al diagnóstico de la EC que pueden predecir la expresión molecular a nivel tumoral. Concretamente, el cortisol basal al diagnóstico se correlaciona inversamente con la expresión de SST₁, SST₂, SST₃, DRD1, DRD2T, DRD2L y DRD5, y el nivel de ACTH al diagnóstico se correlaciona inversamente con la expresión de SST₁, SST₂, SST₃, DRD1, DRD2T, DRD2L, DRD4, DRD5 y GHSR1a.

Por tanto, los resultados de esta Tesis Doctoral aportan una conclusión clínicamente relevante puesto que demuestran por primera vez que el análisis combinado de un conjunto concreto de biomarcadores clínicos y moleculares en la

pieza tumoral de pacientes con EC es capaz de predecir con gran precisión la evolución clínica y la remisión de los pacientes. Por tanto, el perfil molecular posquirúrgico representa una valiosa herramienta para la evaluación clínica y el seguimiento de los pacientes con EC.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Shlomo Melmed MBChB MACP, K.S.P.M., P. Reed Larsen MD FRCP, Henry M. Kronenberg MD, *Williams. Tratado De Endocrinología*. 2017.
2. Lloyd R, O.R., Klöppel G, Rosai J., *WHO Classification of tumours of endocrine organs*. 4 ed. Vol. 10. 2017, Ginebra: World Health Organization. 355.
3. Pico, A., et al., *Recommendations on the pathological report of pituitary tumors. A consensus of experts of the Spanish Society of Endocrinology and Nutrition and the Spanish Society of Pathology*. *Endocrinol Diabetes Nutr*, 2021. **68**(3): p. 196-207.
4. Vlotides, G., T. Eigler, and S. Melmed, *Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis*. *Endocr Rev*, 2007. **28**(2): p. 165-86.
5. Smith, V.E., J.A. Franklyn, and C.J. McCabe, *Pituitary tumor-transforming gene and its binding factor in endocrine cancer*. *Expert Rev Mol Med*, 2010. **12**: p. e38.
6. Lanfranco, F., et al., *Ghrelin and anterior pituitary function*. *Front Horm Res*, 2010. **38**: p. 206-211.
7. Benso, A., et al., *Other than growth hormone neuroendocrine actions of ghrelin*. *Endocr Dev*, 2013. **25**: p. 59-68.
8. Martinez-Fuentes, A.J., et al., *Ghrelin is produced by and directly activates corticotrope cells from adrenocorticotropin-secreting adenomas*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(6): p. 2225-31.
9. Gahete, M.D., et al., *Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight*. *J Endocrinol*, 2014. **220**(1): p. R1-24.
10. Gahete, M.D., et al., *Role of ghrelin system in neuroprotection and cognitive functions: implications in Alzheimer's disease*. *Peptides*, 2011. **32**(11): p. 2225-8.
11. Ben-Shlomo, A. and S. Melmed, *Pituitary somatostatin receptor signaling*. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. **21**(3): p. 123-33.
12. Duran-Prado, M., et al., *Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(7): p. 2634-43.
13. de Bruin, C., et al., *Coexpression of dopamine and somatostatin receptor subtypes in corticotroph adenomas*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(4): p. 1118-24.
14. Tateno, T., et al., *Differential expression of somatostatin and dopamine receptor subtype genes in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors and silent corticotroph adenomas*. *Endocr J*, 2009. **56**(4): p. 579-84.

15. de Bruin, C., et al., *Differential regulation of human dopamine D2 and somatostatin receptor subtype expression by glucocorticoids in vitro*. J Mol Endocrinol, 2009. **42**(1): p. 47-56.
16. Boschetti, M., et al., *Role of dopamine receptors in normal and tumoral pituitary corticotropic cells and adrenal cells*. Neuroendocrinology, 2010. **92 Suppl 1**: p. 17-22.
17. Pivonello, R., et al., *Dopamine receptor expression and function in corticotroph pituitary tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(5): p. 2452-62.
18. Saveanu, A. and P. Jaquet, *Somatostatin-dopamine ligands in the treatment of pituitary adenomas*. Rev Endocr Metab Disord, 2009. **10**(2): p. 83-90.
19. Neto, L.V., et al., *Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(6): p. 1931-7.
20. Hillion, J., et al., *Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 18091-7.
21. Abellan Galiana, P., et al., *[Predictors of long-term remission after transsphenoidal surgery in Cushing's disease]*. Endocrinol Nutr, 2013. **60**(8): p. 475-82.
22. Fleseriu, M., et al., *Consensus on diagnosis and management of Cushing's disease: a guideline update*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2021. **9**(12): p. 847-875.
23. Mathioudakis, N., et al., *ACTH-secreting pituitary adenomas: size does not correlate with hormonal activity*. Pituitary, 2012. **15**(4): p. 526-32.
24. Swiatkowska-Stodulska, R., et al., *Cyclic Cushing's Syndrome - A Diagnostic Challenge*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 658429.
25. Ragnarsson, O., et al., *Overall and Disease-Specific Mortality in Patients With Cushing Disease: A Swedish Nationwide Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2019. **104**(6): p. 2375-2384.
26. Hinojosa-Amaya, J.M., D. Cuevas-Ramos, and M. Fleseriu, *Medical Management of Cushing's Syndrome: Current and Emerging Treatments*. Drugs, 2019. **79**(9): p. 935-956.
27. Hakami, O.A., S. Ahmed, and N. Karavitaki, *Epidemiology and mortality of Cushing's syndrome*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2021. **35**(1): p. 101521.
28. van Haalen, F.M., et al., *Management of endocrine disease: Mortality remains increased in Cushing's disease despite biochemical remission: a systematic review and meta-analysis*. Eur J Endocrinol, 2015. **172**(4): p. R143-9.
29. Tzanela, M., et al., *Assessment of GH reserve before and after successful treatment of adult patients with Cushing's syndrome*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **60**(3): p. 309-14.

30. Pivonello, R., et al., *Complications of Cushing's syndrome: state of the art*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016. **4**(7): p. 611-29.
31. Scherthaner-Reiter, M.H., et al., *Acute and Life-threatening Complications in Cushing Syndrome: Prevalence, Predictors, and Mortality*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021. **106**(5): p. e2035-e2046.
32. Suarez, M.G., et al., *Hypercoagulability in Cushing Syndrome, Prevalence of Thrombotic Events: A Large, Single-Center, Retrospective Study*. *J Endocr Soc*, 2020. **4**(2): p. bvz033.
33. Di Somma, C., et al., *Effect of 2 years of cortisol normalization on the impaired bone mass and turnover in adolescent and adult patients with Cushing's disease: a prospective study*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003. **58**(3): p. 302-8.
34. Bride, M.M., et al., *Quality of life in Cushing's syndrome*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2021. **35**(1): p. 101505.
35. Feelders, R.A. and L.J. Hofland, *Medical treatment of Cushing's disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(2): p. 425-38.
36. Nieman, L.K., et al., *The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(5): p. 1526-40.
37. Vassiliadi, D.A. and S. Tsagarakis, *DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: The role of the desmopressin test in the diagnosis and follow-up of Cushing's syndrome*. *Eur J Endocrinol*, 2018. **178**(5): p. R201-R214.
38. Ritzel, K., et al., *ACTH after 15 min distinguishes between Cushing's disease and ectopic Cushing's syndrome: a proposal for a short and simple CRH test*. *Eur J Endocrinol*, 2015. **173**(2): p. 197-204.
39. Martin, N.M., et al., *Comparison of the dexamethasone-suppressed corticotropin-releasing hormone test and low-dose dexamethasone suppression test in the diagnosis of Cushing's syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(7): p. 2582-6.
40. Moro, M., et al., *The desmopressin test in the differential diagnosis between Cushing's disease and pseudo-Cushing states*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(10): p. 3569-74.
41. Rollin, G.A., et al., *Evaluation of the DDAVP test in the diagnosis of Cushing's Disease*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2015. **82**(6): p. 793-800.
42. Tirabassi, G., et al., *Corticotrophin-releasing hormone and desmopressin tests in the differential diagnosis between Cushing's disease and pseudo-Cushing state: a comparative study*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2011. **75**(5): p. 666-72.
43. Ceccato, F., et al., *Human Corticotropin-Releasing Hormone Tests: 10 Years of Real-Life Experience in Pituitary and Adrenal Disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020. **105**(11).
44. Grober, Y., et al., *Comparison of MRI techniques for detecting microadenomas in Cushing's disease*. *J Neurosurg*, 2018. **128**(4): p. 1051-1057.

45. Losa, M., et al., *Bilateral inferior petrosal sinus sampling in adrenocorticotropin-dependent hypercortisolism: always, never, or sometimes?* J Endocrinol Invest, 2019. **42**(8): p. 997-1000.
46. Zampetti, B., et al., *Bilateral inferior petrosal sinus sampling.* Endocr Connect, 2016. **5**(4): p. R12-25.
47. Feng, M., et al., *Tumour lateralization in Cushing's disease by inferior petrosal sinus sampling with desmopressin.* Clin Endocrinol (Oxf), 2018. **88**(2): p. 251-257.
48. Kaltsas, G.A., et al., *A critical analysis of the value of simultaneous inferior petrosal sinus sampling in Cushing's disease and the occult ectopic adrenocorticotropin syndrome.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(2): p. 487-92.
49. Pereira, C.A., et al., *Diagnostic accuracy of Bilateral Inferior Petrosal Sinus Sampling: The Experience of a Tertiary Centre.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2021. **129**(2): p. 126-130.
50. Deipolyi, A., et al., *Bilateral inferior petrosal sinus sampling: experience in 327 patients.* J Neurointerv Surg, 2017. **9**(2): p. 196-199.
51. Barbot, M., et al., *Second-line tests in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome.* Pituitary, 2016. **19**(5): p. 488-95.
52. Frete, C., et al., *Non-invasive Diagnostic Strategy in ACTH-dependent Cushing's Syndrome.* J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(10).
53. Nieman, L.K., et al., *Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline.* J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(8): p. 2807-31.
54. Bunevicius, A., et al., *Surgical and radiosurgical treatment strategies for Cushing's disease.* J Neurooncol, 2019. **145**(3): p. 403-413.
55. Albani, A. and M. Theodoropoulou, *Persistent Cushing's Disease after Transsphenoidal Surgery: Challenges and Solutions.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2021. **129**(3): p. 208-215.
56. Braun, L.T., et al., *Recurrence after pituitary surgery in adult Cushing's disease: a systematic review on diagnosis and treatment.* Endocrine, 2020. **70**(2): p. 218-231.
57. Ioachimescu, A.G., *Prognostic Factors of Long-Term Remission After Surgical Treatment of Cushing's Disease.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2018. **47**(2): p. 335-347.
58. Broersen, L.H.A., et al., *Endoscopic vs. microscopic transsphenoidal surgery for Cushing's disease: a systematic review and meta-analysis.* Pituitary, 2018. **21**(5): p. 524-534.
59. Capatina, C., et al., *Management of patients with persistent or recurrent Cushing's disease after initial pituitary surgery.* Expert Rev Endocrinol Metab, 2020. **15**(5): p. 321-339.

60. Pivonello, R., et al., *The Treatment of Cushing's Disease*. *Endocr Rev*, 2015. **36**(4): p. 385-486.
61. Tritos, N.A. and B.M.K. Biller, *Advances in the Medical Treatment of Cushing Disease*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2020. **49**(3): p. 401-412.
62. Broersen, L.H.A., et al., *Effectiveness of medical treatment for Cushing's syndrome: a systematic review and meta-analysis*. *Pituitary*, 2018. **21**(6): p. 631-641.
63. Hofland, L.J., *Somatostatin and somatostatin receptors in Cushing's disease*. *Mol Cell Endocrinol*, 2008. **286**(1-2): p. 199-205.
64. Hofland, L.J., S.W. Lamberts, and R.A. Feelders, *Role of somatostatin receptors in normal and tumoral pituitary corticotropic cells*. *Neuroendocrinology*, 2010. **92 Suppl 1**: p. 11-6.
65. Colao, A., et al., *A 12-month phase 3 study of pasireotide in Cushing's disease*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(10): p. 914-24.
66. Pivonello, R., et al., *Pasireotide treatment significantly improves clinical signs and symptoms in patients with Cushing's disease: results from a Phase III study*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2014. **81**(3): p. 408-17.
67. Petersenn, S., et al., *Long-term treatment of Cushing's disease with pasireotide: 5-year results from an open-label extension study of a Phase III trial*. *Endocrine*, 2017. **57**(1): p. 156-165.
68. Lacroix, A., et al., *Efficacy and safety of once-monthly pasireotide in Cushing's disease: a 12 month clinical trial*. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018. **6**(1): p. 17-26.
69. Lacroix, A., et al., *Long-acting pasireotide improves clinical signs and quality of life in Cushing's disease: results from a phase III study*. *J Endocrinol Invest*, 2020. **43**(11): p. 1613-1622.
70. Fleseriu, M., et al., *Long-term efficacy and safety of once-monthly pasireotide in Cushing's disease: A Phase III extension study*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2019. **91**(6): p. 776-785.
71. Godbout, A., et al., *Cabergoline monotherapy in the long-term treatment of Cushing's disease*. *Eur J Endocrinol*, 2010. **163**(5): p. 709-16.
72. Ferriere, A., et al., *Cabergoline for Cushing's disease: a large retrospective multicenter study*. *Eur J Endocrinol*, 2017. **176**(3): p. 305-314.
73. Pivonello, R., et al., *The medical treatment of Cushing's disease: effectiveness of chronic treatment with the dopamine agonist cabergoline in patients unsuccessfully treated by surgery*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(1): p. 223-30.
74. Cantone, M.C., A. Dicitore, and G. Vitale, *Somatostatin-Dopamine Chimeric Molecules in Neuroendocrine Neoplasms*. *J Clin Med*, 2021. **10**(3).

75. Castinetti, F., et al., *Approach to the Patient Treated with Steroidogenesis Inhibitors*. J Clin Endocrinol Metab, 2021. **106**(7): p. 2114-2123.
76. Varlamov, E.V., A.J. Han, and M. Fleseriu, *Updates in adrenal steroidogenesis inhibitors for Cushing's syndrome - A practical guide*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2021. **35**(1): p. 101490.
77. Ceccato, F., et al., *Metyrapone treatment in Cushing's syndrome: a real-life study*. Endocrine, 2018. **62**(3): p. 701-711.
78. Fleseriu, M., et al., *A new therapeutic approach in the medical treatment of Cushing's syndrome: glucocorticoid receptor blockade with mifepristone*. Endocr Pract, 2013. **19**(2): p. 313-26.
79. Valassi, E., et al., *Preoperative medical treatment in Cushing's syndrome: frequency of use and its impact on postoperative assessment: data from ERCUSYN*. Eur J Endocrinol, 2018. **178**(4): p. 399-409.
80. Castinetti, F., et al., *Ketoconazole in Cushing's disease: is it worth a try?* J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(5): p. 1623-30.
81. Daniel, E., et al., *Effectiveness of Metyrapone in Treating Cushing's Syndrome: A Retrospective Multicenter Study in 195 Patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(11): p. 4146-54.
82. Hughes, J.D., et al., *Radiosurgical Management of Patients With Persistent or Recurrent Cushing Disease After Prior Transsphenoidal Surgery: A Management Algorithm Based on a 25-Year Experience*. Neurosurgery, 2020. **86**(4): p. 557-564.
83. Ironside, N., et al., *Outcomes of Pituitary Radiation for Cushing's Disease*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2018. **47**(2): p. 349-365.
84. Starke, R.M., et al., *Radiation therapy and stereotactic radiosurgery for the treatment of Cushing's disease: an evidence-based review*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010. **17**(4): p. 356-64.
85. Shepard, M.J., et al., *Technique of Whole-Sellar Stereotactic Radiosurgery for Cushing Disease: Results from a Multicenter, International Cohort Study*. World Neurosurg, 2018. **116**: p. e670-e679.
86. Mehta, G.U., et al., *Stereotactic Radiosurgery for Cushing Disease: Results of an International, Multicenter Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2017. **102**(11): p. 4284-4291.
87. Gupta, A., et al., *Upfront Gamma Knife radiosurgery for Cushing's disease and acromegaly: a multicenter, international study*. J Neurosurg, 2018. **131**(2): p. 532-538.
88. Guerin, C., et al., *Bilateral adrenalectomy in the 21st century: when to use it for hypercortisolism?* Endocr Relat Cancer, 2016. **23**(2): p. R131-42.

89. Reincke, M., et al., *A critical reappraisal of bilateral adrenalectomy for ACTH-dependent Cushing's syndrome*. Eur J Endocrinol, 2015. **173**(4): p. M23-32.
90. Osswald, A., et al., *Favorable long-term outcomes of bilateral adrenalectomy in Cushing's disease*. Eur J Endocrinol, 2014. **171**(2): p. 209-15.
91. Fountas, A., et al., *Outcomes of Patients with Nelson's Syndrome after Primary Treatment: A Multicenter Study from 13 UK Pituitary Centers*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(5).
92. Reincke, M., et al., *Corticotroph tumor progression after bilateral adrenalectomy (Nelson's syndrome): systematic review and expert consensus recommendations*. Eur J Endocrinol, 2021. **184**(3): p. P1-P16.
93. Stroud, A., et al., *Outcomes of pituitary surgery for Cushing's disease: a systematic review and meta-analysis*. Pituitary, 2020. **23**(5): p. 595-609.
94. Ciric, I., et al., *Transsphenoidal surgery for Cushing disease: experience with 136 patients*. Neurosurgery, 2012. **70**(1): p. 70-80; discussion 80-1.
95. Petersenn, S., et al., *Therapy of endocrine disease: outcomes in patients with Cushing's disease undergoing transsphenoidal surgery: systematic review assessing criteria used to define remission and recurrence*. Eur J Endocrinol, 2015. **172**(6): p. R227-39.
96. Ayala, A. and A.J. Manzano, *Detection of recurrent Cushing's disease: proposal for standardized patient monitoring following transsphenoidal surgery*. J Neurooncol, 2014. **119**(2): p. 235-42.
97. Abu Dabrh, A.M., et al., *Predictors of Biochemical Remission and Recurrence after Surgical and Radiation Treatments of Cushing Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Endocr Pract, 2016. **22**(4): p. 466-75.
98. Pendharkar, A.V., et al., *Cushing's disease: predicting long-term remission after surgical treatment*. Neurosurg Focus, 2015. **38**(2): p. E13.
99. Krikorian, A., et al., *Cushing disease: use of perioperative serum cortisol measurements in early determination of success following pituitary surgery*. Neurosurg Focus, 2007. **23**(3): p. E6.
100. Patil, C.G., et al., *Late recurrences of Cushing's disease after initial successful transsphenoidal surgery*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(2): p. 358-62.
101. Hinojosa-Amaya, J.M. and D. Cuevas-Ramos, *The definition of remission and recurrence of Cushing's disease*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2021. **35**(1): p. 101485.
102. Amlashi, F.G., et al., *Accuracy of Late-Night Salivary Cortisol in Evaluating Postoperative Remission and Recurrence in Cushing's Disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(10): p. 3770-7.

103. Carroll, T.B., B.R. Javorsky, and J.W. Findling, *Postsurgical Recurrent Cushing Disease: Clinical Benefit of Early Intervention in Patients with Normal Urinary Free Cortisol*. *Endocr Pract*, 2016. **22**(10): p. 1216-1223.
104. Roelfsema, F., N.R. Biermasz, and A.M. Pereira, *Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis*. *Pituitary*, 2012. **15**(1): p. 71-83.
105. Cassarino, M.F., et al., *Proopiomelanocortin, glucocorticoid, and CRH receptor expression in human ACTH-secreting pituitary adenomas*. *Endocrine*, 2017. **55**(3): p. 853-860.
106. Ibáñez-Costa, A., et al., *In1-ghrelin splicing variant is overexpressed in pituitary adenomas and increases their aggressive features*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 8714.
107. Guadagno, E., et al., *Ki67 in endocrine neoplasms: to count or not to count, this is the question! A systematic review from the English language literature*. *J Endocrinol Invest*, 2020. **43**(10): p. 1429-1445.
108. Turner, H.E., et al., *The enhanced peroxidase one step method increases sensitivity for detection of Ki-67 in pituitary tumours*. *J Clin Pathol*, 1999. **52**(8): p. 624-6.
109. Keskin, F.E., et al., *Outcomes of Primary Transsphenoidal Surgery in Cushing Disease: Experience of a Tertiary Center*. *World Neurosurg*, 2017. **106**: p. 374-381.
110. Losa, M., et al., *Determination of the proliferation and apoptotic index in adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors : comparison between micro- and macroadenomas*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(1): p. 245-51.
111. Liu, X., et al., *Expression of Matrix Metalloproteinase-9, Pituitary Tumor Transforming Gene, High Mobility Group A 2, and Ki-67 in Adrenocorticotropic Hormone-Secreting Pituitary Tumors and Their Association with Tumor Recurrence*. *World Neurosurg*, 2018. **113**: p. e213-e221.
112. Tfelt-Hansen, J., D. Kanuparthi, and N. Chattopadhyay, *The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis*. *Clin Med Res*, 2006. **4**(2): p. 130-7.
113. Luque, R.M., et al., *A cellular and molecular basis for the selective desmopressin-induced ACTH release in Cushing disease patients: key role of AVPR1b receptor and potential therapeutic implications*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(10): p. 4160-9.
114. Venegas-Moreno, E., et al., *Association between dopamine and somatostatin receptor expression and pharmacological response to somatostatin analogues in acromegaly*. *J Cell Mol Med*, 2018. **22**(3): p. 1640-1649.
115. Taboada, G.F., et al., *Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas*. *Eur J Endocrinol*, 2007. **156**(1): p. 65-74.

116. Casarini, A.P., et al., *Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment*. Pituitary, 2009. **12**(4): p. 297-303.
117. Wildemberg, L.E., et al., *Low somatostatin receptor subtype 2, but not dopamine receptor subtype 2 expression predicts the lack of biochemical response of somatotropinomas to treatment with somatostatin analogs*. J Endocrinol Invest, 2013. **36**(1): p. 38-43.
118. Iacovazzo, D., et al., *Factors predicting pasireotide responsiveness in somatotroph pituitary adenomas resistant to first-generation somatostatin analogues: an immunohistochemical study*. Eur J Endocrinol, 2016. **174**(2): p. 241-50.
119. Bression, D., et al., *Evidence of dopamine receptors in human growth hormone (GH)-secreting adenomas with concomitant study of dopamine inhibition of GH secretion in a perfusion system*. J Clin Endocrinol Metab, 1982. **55**(3): p. 589-93.
120. de Herder, W.W., et al., *Comparison of iodine-123 epidepride and iodine-123 IBZM for dopamine D2 receptor imaging in clinically non-functioning pituitary macroadenomas and macroprolactinomas*. Eur J Nucl Med, 1999. **26**(1): p. 46-50.
121. Wanichi, I.Q., et al., *Cushing's disease due to somatic USP8 mutations: a systematic review and meta-analysis*. Pituitary, 2019. **22**(4): p. 435-442.
122. Hinojosa-Amaya, J.M., et al., *Hypercortisolemia Recurrence in Cushing's Disease; a Diagnostic Challenge*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 740.
123. Guignat, L. and J. Bertherat, *The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline: commentary from a European perspective*. Eur J Endocrinol, 2010. **163**(1): p. 9-13.
124. Vázquez-Borrego, M.C., et al., *A Somatostatin Receptor Subtype-3 (SST3) Peptide Agonist Shows Antitumor Effects in Experimental Models of Nonfunctioning Pituitary Tumors*. Clin Cancer Res, 2020. **26**(4): p. 957-969.
125. Luque, R.M., S. Park, and R.D. Kineman, *Severity of the catabolic condition differentially modulates hypothalamic expression of growth hormone-releasing hormone in the fasted mouse: potential role of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone*. Endocrinology, 2007. **148**(1): p. 300-9.
126. Luque, R.M., et al., *The Molecular Registry of Pituitary Adenomas (REMAH): A bet of Spanish Endocrinology for the future of individualized medicine and translational research*. Endocrinol Nutr, 2016. **63**(6): p. 274-84.
127. Xie, F., et al., *miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs*. Plant Mol Biol, 2012.
128. Luque, R.M., et al., *A cellular and molecular basis for the selective desmopressin-induced ACTH release in Cushing disease patients: key role of AVPR1b receptor and potential therapeutic implications*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(10): p. 4160-9.

129. Leal-Cerro, A., et al., *Desmopressin test in the diagnosis and follow-up of cyclical Cushing's disease*. *Endocrinol Nutr*, 2014. **61**(2): p. 69-76.
130. Puig-Domingo, M., et al., *Use of lanreotide in combination with cabergoline or pegvisomant in patients with acromegaly in the clinical practice: The ACROCOMB study*. *Endocrinol Nutr*, 2016. **63**(8): p. 397-408.
131. Alhambra-Expósito, M.R., et al., *Association between radiological parameters and clinical and molecular characteristics in human somatotropinomas*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 6173.
132. Garcia-Martinez, A., et al., *Differential Expression of MicroRNAs in Silent and Functioning Corticotroph Tumors*. *J Clin Med*, 2020. **9**(6).
133. Luque, R.M., et al., *Truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 confers aggressive features (proliferation, invasion and reduced octreotide response) to somatotropinomas*. *Cancer Lett*, 2015. **359**(2): p. 299-306.
134. Chandler, W.F., et al., *Outcome of Transsphenoidal Surgery for Cushing Disease: A Single-Center Experience Over 32 Years*. *Neurosurgery*, 2016. **78**(2): p. 216-23.
135. Alexandraki, K.I., et al., *Long-term remission and recurrence rates in Cushing's disease: predictive factors in a single-centre study*. *Eur J Endocrinol*, 2013. **168**(4): p. 639-48.
136. Moreno-Moreno, P., et al., *Integrative clinical, radiological and molecular analysis for predicting remission and recurrence of Cushing's disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2022.
137. Cebula, H., et al., *Efficacy of endoscopic endonasal transsphenoidal surgery for Cushing's disease in 230 patients with positive and negative MRI*. *Acta Neurochir (Wien)*, 2017. **159**(7): p. 1227-1236.
138. Hameed, N., et al., *Remission rate after transsphenoidal surgery in patients with pathologically confirmed Cushing's disease, the role of cortisol, ACTH assessment and immediate reoperation: a large single center experience*. *Pituitary*, 2013. **16**(4): p. 452-8.
139. Lambert, J.K., et al., *Predictors of mortality and long-term outcomes in treated Cushing's disease: a study of 346 patients*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013. **98**(3): p. 1022-30.
140. Salmon, P.M., et al., *Utility of Adrenocorticotrophic Hormone in Assessing the Response to Transsphenoidal Surgery for Cushing's Disease*. *Endocr Pract*, 2014. **20**(11): p. 1159-64.
141. Lindsay, J.R., et al., *The postoperative basal cortisol and CRH tests for prediction of long-term remission from Cushing's disease after transsphenoidal surgery*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(7): p. 2057-64.

142. Bansal, P., et al., *Duration of post-operative hypocortisolism predicts sustained remission after pituitary surgery for Cushing's disease*. *Endocr Connect*, 2017. **6**(8): p. 625-636.
143. Biller, B.M., et al., *Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(7): p. 2454-62.
144. Liu, Y., et al., *Prediction of Recurrence after Transsphenoidal Surgery for Cushing's Disease: The Use of Machine Learning Algorithms*. *Neuroendocrinology*, 2019. **108**(3): p. 201-210.
145. Zoli, M., et al., *Machine learning-based prediction of outcomes of the endoscopic endonasal approach in Cushing disease: is the future coming?* *Neurosurg Focus*, 2020. **48**(6): p. E5.
146. Ben-Shlomo, A., et al., *Differential ligand-mediated pituitary somatostatin receptor subtype signaling: implications for corticotroph tumor therapy*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(11): p. 4342-50.
147. Langlois, F., J. Chu, and M. Fleseriu, *Pituitary-Directed Therapies for Cushing's Disease*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 164.
148. Pedraza-Arevalo, S., et al., *Somatostatin receptor subtype 1 as a potential diagnostic marker and therapeutic target in prostate cancer*. *Prostate*, 2017. **77**(15): p. 1499-1511.
149. Zatelli, M.C., et al., *Somatostatin receptor subtype 1-selective activation reduces cell growth and calcitonin secretion in a human medullary thyroid carcinoma cell line*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **297**(4): p. 828-34.
150. Zatelli, M.C., et al., *Somatostatin receptor subtype 1 selective activation in human growth hormone (GH)- and prolactin (PRL)-secreting pituitary adenomas: effects on cell viability, GH, and PRL secretion*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(6): p. 2797-802.
151. Ishihara, S., et al., *Growth inhibitory effects of somatostatin on human leukemia cell lines mediated by somatostatin receptor subtype 1*. *Peptides*, 1999. **20**(3): p. 313-8.
152. de Bruin, C., et al., *Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2009. **10**(2): p. 91-102.
153. Pivonello, R., et al., *Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(4): p. 1674-83.
154. Flores-Martinez, A., et al., *Quantitative Analysis of Somatostatin and Dopamine Receptors Gene Expression Levels in Non-functioning Pituitary Tumors and Association with Clinical and Molecular Aggressiveness Features*. *J Clin Med*, 2020. **9**(9).

155. Miljic, D., et al., *Combined Administration of Ghrelin and Corticotropin-Releasing Hormone in the Diagnosis of Cushing's Disease*. *Neuroendocrinology*, 2017. **104**(1): p. 33-39.
156. Giordano, R., et al., *Ghrelin, hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and Cushing's syndrome*. *Pituitary*, 2004. **7**(4): p. 243-8.
157. Herrera-Martínez, A.D., et al., *Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) enzyme as a novel potential biomarker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. *Clin Transl Gastroenterol*, 2018. **9**(10): p. 196.
158. Chanson, P., et al., *Management of clinically non-functioning pituitary adenoma*. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2015. **76**(3): p. 239-47.
159. Trott, G., et al., *PTTG overexpression in non-functioning pituitary adenomas: Correlation with invasiveness, female gender and younger age*. *Ann Diagn Pathol*, 2019. **41**: p. 83-89.
160. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(4): p. 227-32.
161. Nagaraj, N., et al., *Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line*. *Mol Syst Biol*, 2011. **7**: p. 548.

8. ANEXO

Integrative Clinical, Radiological, and Molecular Analysis for Predicting Remission and Recurrence of Cushing Disease

Paloma Moreno-Moreno,^{1,2,3} Alejandro Ibáñez-Costa,^{1,2,4,5} Eva Venegas-Moreno,⁶ Antonio C. Fuentes-Fayos,^{1,2,4,5} María R. Alhambra-Expósito,^{1,2,3} Carmen Fajardo-Montañana,⁷ Araceli García-Martínez,^{1,2,4} Elena Dios,⁶ Mari C. Vázquez-Borrego,^{1,2,4,5} Pablo Remón-Ruiz,⁶ Rosa Cámara,⁸ Cristina Lamas,⁹ José Carlos Padillo-Cuenca,^{1,2,3} Juan Solivera,¹⁰ David A. Cano,⁶ Manuel D. Gahete,^{1,2,4,5} Aura D. Herrera-Martínez,^{1,2,3}  Antonio Picó,¹¹ Alfonso Soto-Moreno,⁶ María Ángeles Gálvez-Moreno,^{1,2,3} Justo P. Castaño,^{1,2,4,5}  and Raúl M. Luque^{1,2,4,5} 

¹Maimonides Biomedical Research Institute of Cordoba (IMIBIC), 14004 Cordoba, Spain

²Reina Sofia University Hospital (HURS), 14004 Cordoba, Spain

³Service of Endocrinology and Nutrition, IMIBIC, HURS, 14004 Cordoba, Spain

⁴Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, 14004 Cordoba, Spain

⁵CIBER Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBERObn), 14004 Cordoba, Spain

⁶Unidad de Gestión de Endocrinología y Nutrición. Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, 41013 Sevilla, Spain

⁷Department of Endocrinology, Hospital Universitario de La Ribera, Alzira, 46600, Valencia, Spain

⁸Department of Endocrinology and Nutrition, Polytechnic University Hospital La Fe, 46026, Valencia, Spain

⁹Department of Endocrinology and Nutrition, Albacete University Hospital, 02006, Albacete, Spain

¹⁰Service of Neurosurgery, HURS, 14004 Cordoba, Spain

¹¹Department of Endocrinology and Nutrition, Alicante General University Hospital. Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL). University Miguel Hernandez, CIBER Rare Diseases, 03010, Alicante, Spain

Correspondence: R. M. Luque, PhD, IMIBIC Building, Av. Menéndez Pidal s/n. 14004-Córdoba, Spain. Email: raul.luque@uco.es; or J. P. Castaño, PhD, IMIBIC Building, Av. Menéndez Pidal s/n. 14004-Córdoba, Spain. Email: justo@uco.es; or A. D. Herrera-Martínez, MD, PhD, IMIBIC Building, Av. Menéndez Pidal s/n. 14004-Córdoba, Spain. Email: aura.herrera.sspa@juntadeandalucia.es.

Abstract

Context: Adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors (ACTHomas) are associated with severe comorbidities and increased mortality. Current treatments mainly focus on remission and prevention of persistent disease and recurrence. However, there are still no useful biomarkers to accurately predict the clinical outcome after surgery, long-term remission, or disease relapse.

Objectives: This work aimed to identify clinical, biochemical, and molecular markers for predicting long-term clinical outcome and remission in ACTHomas.

Methods: A retrospective multicenter study was performed with 60 ACTHomas patients diagnosed between 2004 and 2018 with at least 2 years' follow-up. Clinical/biochemical variables were evaluated yearly. Molecular expression profile of the somatostatin/ghrelin/dopamine regulatory systems components and of key pituitary factors and proliferation markers were evaluated in tumor samples after the first surgery.

Results: Clinical variables including tumor size, time until diagnosis/first surgery, serum prolactin, and postsurgery cortisol levels were associated with tumor remission and relapsed disease. The molecular markers analyzed were distinctly expressed in ACTHomas, with some components (ie, *SSTR1*, *CRHR1*, and *MKI67*) showing instructive associations with recurrence and/or remission. Notably, an integrative model including selected clinical variables (tumor size/postsurgery serum cortisol), and molecular markers (*SSTR1/CRHR1*) can accurately predict the clinical evolution and remission of patients with ACTHomas, generating a receiver operating characteristic curve with an area under the curve of 1 ($P < .001$).

Conclusion: This study demonstrates that the combination of a set of clinical and molecular biomarkers in ACTHomas is able to accurately predict the clinical evolution and remission of patients. Consequently, the postsurgery molecular profile represents a valuable tool for clinical evaluation and follow-up of patients with ACTHomas.

Key Words: ACTH-secreting pituitary tumors, Cushing disease, biochemical variables, molecular markers, predictive biomarkers, remission, relapsed disease
Abbreviations: ACTH, adrenocorticotropin; ACTHoma, adrenocorticotropin-secreting pituitary tumor; AUC, area under the curve; CD, Cushing disease; DST, dexamethasone suppression test; LNSC, late-night salivary cortisol; mRNA, messenger RNA; OR, odds ratio; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; ROC, receiver operating characteristic; TSH, thyrotropin; UFC, 24-hour urinary free cortisol.

Received: 29 December 2021. Editorial Decision: 15 March 2022. Corrected and Typeset: 23 April 2022

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of the Endocrine Society. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Cushing disease (CD) is the most frequent cause of endogenous hypercortisolism. It originates with an adrenocorticotropic (ACTH)-secreting pituitary tumor (ACTHoma) (1). The incidence of CD, which ranges from 0.7 to 2.4 cases per million inhabitants/year, is more frequent between the third and fourth decade of life and is 8 times more common in women (1). In this sense, a relevant clinical problem of patients with CD is their considerable morbidity and increased mortality. Uncontrolled hypercortisolemia is associated with metabolic, cardiovascular, cognitive, and psychological alterations, and in consequence with increased mortality (2). Normalization of cortisol levels leads to substantial improvement in these parameters and decreased mortality (3, 4). However, growing evidence indicates that the risk of developing certain morbidities, in particular cardiovascular diseases, persists for several years after remission (4, 5). In this context, control of hypercortisolism and management of comorbidities in a multidisciplinary setting, together with long-term follow-up, are essential for optimal recovery in CD (2, 6).

In general, duration of hypercortisolism in CD appears to be inversely related to the reversibility of different complications, which, in turn, can increase mortality. This indicates that once the diagnosis of CD has been established, the production of cortisol should be normalized as soon as possible (7). Transsphenoidal surgery remains the first-line therapy, but persistence and recurrence of CD is substantial after surgery. Indeed, about 1% of patients with CD do not achieve remission after transsphenoidal pituitary surgery, and many patients recur annually after achieving surgical remission, leading to a cumulative recurrence rate that ranges from 8% to 66% during long-term follow-up (8-10).

Several epidemiologic variables, biochemical values, and functional tests have been evaluated for predicting remission and clinical evolution of these patients with contradicting results (7, 9). In addition, although it has been suggested that some genetic mutations might be associated with recurrence rate (ie, patients with a *USP8* mutation presented with a higher recurrence rate) (11), to the best of our knowledge, no molecular markers have been identified to date for predicting long-term clinical outcomes and remission in ACTHomas after transsphenoidal surgery. In this scenario, it has been previously shown that some components of the somatostatin, ghrelin, and dopamine regulatory systems could play relevant functional roles in ACTHomas, which can entail clinical implications (12-16). In fact, in other pituitary tumors, the expression levels of some elements of these regulatory systems have been associated with tumor size, behavior prediction, and response to treatment with first-generation somatostatin analogues or dopamine agonists (14, 17-20).

Based on the aforementioned information, we aimed to analyze the clinical behavior of a well-characterized cohort of patients with ACTHomas (N = 60) with a minimum follow-up of 2 years, and evaluated individually and collectively several clinical, biochemical, and molecular markers (including the expression of somatostatin, ghrelin and dopamine system components) for predicting long-term clinical outcomes and remission in these patients.

Materials and Methods

Patients

Clinical and molecular variables of 60 patients harboring ACTHomas from different hospitals in Spain were analyzed

in the present study (mean age at diagnosis, 40 years [range, 15-78 years]; 88% women). All techniques carried out in this study were conducted in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki, the World Medical Association, and with the approval of the ethics committees from all hospitals involved in the study. Informed consent from each patient was obtained. Specifically, patients with ACTHomas who underwent surgery from 2004 to 2018 and with a minimum follow-up of 2 years were included (follow-up time 24-152 months after surgery). Demographic, clinical, radiological, and biochemical characteristics of the patients were collected to analyze potential associations with molecular data (discussed later) and are summarized in Tables 1 and 2. Clinical response and long-term follow-up in patients with ACTHomas were estimated by remission after surgery and the presence of recurrence, respectively. Remission was defined as normalization of 24-hour urinary free cortisol (UFC), late-night salivary cortisol (LNSC), and overnight 1-mg dexamethasone suppression test (DST) in patients who did not present central adrenal failure after surgery (cutoffs for this test are $< 5 \mu\text{g/dL}$, and are usually performed immediately after surgery or within 1 month). Recurrence after successful pituitary surgery was defined as the reappearance of clinical and biochemical features of hypercortisolism after initial remission (upper levels UFC [$1.6 \times$ upper level of normal]) and/or upper levels LNSC (cutoff = $0.27 \mu\text{g/dL}$ or 7.5 mmol/L) and/or lack of inhibition of plasma cortisol after overnight 1-mg DST (cutoff $> 1.8 \mu\text{g/dL}$) (21, 22). Cortisol levels were analyzed after 1 mg of dexamethasone 1 month after surgery in all patients who did not present with hypocortisolism after surgery.

Patients were treated according to the available clinical guidelines (23-25). Surgery was performed in all patients. Standardized protocols were followed in the different institutions participating in this study to obtain tumor samples immediately after the surgery, keeping them in phosphate-buffered saline for immediate examination and processing by an experienced pathologist. Specifically, the pathologist preserved a fragment for anatomopathological analyses and another fragment was rapidly transferred and stored in RNA-later reagent (a solution used for RNA stabilization and storage that protects the integrity of RNA in unfrozen tissue samples). Samples were immediately shipped to the laboratory in Cordoba wherein RNA extraction was immediately performed (≤ 24 hours), and the integrity of the RNA analyzed using a Bioanalyzer. RNA was stored frozen at -80°C until the reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analyses, as previously reported (26, 27). To ensure the pituitary tumor tissues were not contaminated by normal pituitary tissues, the phenotype of the pituitary samples collected was always confirmed by 3 separate methods, as previously described (27): histological examination by an expert anatomopathologist; through a molecular screening by qPCR (including expression of all pituitary hormone types); and, whenever possible, by testing the hormonal phenotype using single-cell secretion. Therefore, in this study we have confirmed that all the samples analyzed were ACTHoma tissues.

RNA Isolation, Reverse Transcription, and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction

RNA extraction followed by reverse transcription and qPCR were performed for each sample, as previously described

Table 1. Baseline demographic, clinical, radiological, and biochemical characteristics of patients with adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors (n = 60)

Demographics, Sex (M/F)	7 (11.7%)/53 (88.3%)	Comorbidities	
Age at diagnosis, y	40 ± 19 (15-78)	Arterial hypertension	30 (50%)
BMI	31.22 ± 12.75 (20.58-50.77)	Dyslipidemia	13 (21.7%)
Cyclic Cushing disease	4 (6.7%)	Type 2 diabetes	17 (28.3%)
Signs and symptoms		Osteoporosis	12 (44.4%)
Central obesity	42 (85.7%)	Atypical fracture	5 (8.5%)
Facial plethora	39 (88.6%)	Infections	2 (3.4%)
Cutaneous atrophy	20 (74.1%)	Cardiovascular disease	4 (6.7%)
Full-moon face	39 (88.6%)	Autoimmune disease	8 (13.8%)
Cervical lipomatosis	33 (78.6%)	Gastric ulcer	3 (5.1%)
Supraclavicular fat	29 (78.4%)	Time from symptoms onset to diagnosis, mo	24 ± 35 (1-120)
Hirsutism	27 (79.4%)	Radiological variables	
Muscular atrophy	26 (78.8%)	Tumor size, mm	8 ± 10 (3-35)
Amenorrhea	11 (50%)	Macroadenoma/Microadenoma	26 (43.3%)/34 (56.7%)
Red abdominal stretch marks	27 (60%)	Biochemical variables	
Capillary fragility	16 (59.3%)	Baseline serum cortisol after 1 mg dexamethasone, µg/dL	12.64 ± 14.34 (0.34-41)
Acne	12 (70.6%)	Presurgery baseline cortisol, µg/dL	23 ± 8.2 (7.9-71.90)
Lower-limb edema	7 (36.8%)	Presurgery midnight serum cortisol, µg/dL	12.60 ± 9.52 (3.55-74)
Headache	7 (12.7%)	Presurgery LNSC, µg/dL	0.66 ± 1.36 (0.02-30)
Asthenia	28 (87.5%)	Presurgery 24-h urinary cortisol, µg/24 h	316 ± 380.88 (21.90-3729.15)
Visual defects	3 (5.5%)	Presurgery serum ACTH, pg/mL	74.48 ± 64.80 (12-281)
Emotional lability	19 (82.6%)		
Depression	11 (25%)		
Psychosis	2 (3.3%)		

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotropin; BMI, body mass index; F, female; M, male.

(28). Specifically, expression levels (absolute mRNA copy number/50 ng of sample) of different key regulatory components of the hypothalamic-pituitary-corticotrophic axis, including receptors (somatostatin [*SSTR1*, *SSTR2*, *SSTR3*, *SSTR5*, and truncated splicing variants, *SST₅TMD5* and *SST₅TMD4*], dopamine [*DRD1*, *DRD2* total and *DRD2* long isoform, *DRD4*, and *DRD5*], ghrelin [*GHSR1a* and truncated *GHSR1b* variant], corticotropin-releasing hormone [*CRHR1*] and arginine vasopressin receptor 1b [*AVPR1b*]), hormones/enzymes (pro-opiomelanocortin [*POMC*]; precursor of ACTH], ghrelin, In1-ghrelin variant, and ghrelin O-acyl transferase enzyme [*GOAT*]), and proliferation markers (pituitary tumor transforming gene [*PTTG1*] and *MKI67*) were measured using previously validated primers (28). We evaluated the stability of the expression of 3 reference genes (beta actin, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [*ACTB*, *HPRT1*, and *GAPDH*, respectively]) in all samples using RefFinder, a comprehensive tool that integrates the currently available major computational programs (29), and found *HPRT1* to be the most stable. Taking this into account, the expression values of the genes of interest were normalized to *HPRT1* levels.

Determination of Biochemical Variables

Measurement of cortisol, ACTH, prolactin, and thyrotropin (TSH) levels was performed in the laboratory services of the different hospitals involved using different

assays and following the manufacturers' instructions, as previously reported (14, 27, 30-34). It should be noted that the biochemical magnitudes measured and included in this manuscript (cortisol, ACTH, prolactin, and TSH) lack bias attributable to interassay variability (intralaboratory/interlaboratory) inside/between the different hospitals since all the assays were performed under the same quality control program (ie, an internal quality control program and an external quality control program according to the indications of the International Federation of Clinical Chemistry and the American Association for Clinical Chemistry).

Statistical Analysis

Mann-Whitney *U* tests were used to evaluate clinical-molecular associations within ACTHoma samples. The chi-square test was used to compare categorical data. Kruskal-Wallis and analyses of variance were used for multiple comparisons. Binomial univariate and multivariable logistic regression analyses were performed to assess the risk factors for long-term outcome of CD patients. Receiver operating characteristic (ROC) curves were performed for evaluation of the discriminant accuracy of binomial logistic regression models between cured and noncured CD patients. Statistical analyses were performed using SPSS v20, and GraphPad Prism v7. Graphs and tables include data expressed as median ± interquartile range. Moreover, minimum to maximum range is indicated in the tables to outline the distribution of each parameter.

Table 2. Baseline clinical characteristics of patients with adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors. Comparison between groups based on remission after first surgery and recurrence of disease

Clinical characteristics	Total (N = 60)	Remission after surgery (n = 45)	No remission after surgery (n = 15)	P	Recurrence (n = 12)	Nonrecurrence (n = 33)	P
Sex (M/F)	7 (11.7%)/53 (88.3%)	2 (4.4%)/43 (95.6%)	5 (33.3%)/10 (66.7%)	.008	0/12 (100%)	2 (6.1%)/31 (93.9%)	≥ .999
Age at diagnosis, y	40 ± 19 (15-78)	40 ± 17 (15-78)	44 ± 25 (24-68)	.463	36 ± 21 (15-65)	40 ± 23 (17-78)	.310
BMI	31.22 ± 12.75 (20.58-50.77)	31.05 ± 10.66 (20.58-50.77)	32.64 ± 16.30 (22.67-49)	.671	28.93 ± 9.81 (23.09-39.96)	31.22 ± 11.55 (20.58-50.77)	.445
Cyclic Cushing disease	4 (6.7%)	4 (8.9%)	0	.564	0	21 (91.3%)	.561
Signs and symptoms							
Central obesity	42 (85.7%)	30 (81.1%)	12 (100%)	.171	9 (81.8%)	21 (80.8%)	≥ .999
Facial plethora	39 (88.6%)	32 (94.1%)	7 (70%)	.069	11 (100%)	3 (75%)	≥ .999
Cutaneous atrophy	20 (74.1%)	14 (73.7%)	6 (75%)	≥ .999	8 (88.9%)	6 (60%)	0.303
Full-moon face	39 (88.6%)	31 (91.2%)	8 (80%)	.317	11 (100%)	20 (87%)	0.535
Cervical lipomatosis	33 (78.6%)	27 (84.4%)	6 (60%)	.181	8 (80%)	16 (86.4%)	.637
Supraclavicular fat	29 (78.4%)	22 (81.5%)	7 (70%)	.655	8 (88.9%)	14 (77.8%)	.636
Hirsutism	27 (79.4%)	21 (87.5%)	6 (60%)	.157	7 (100%)	14 (82.4%)	.530
Muscular atrophy	26 (78.8%)	19 (86.4%)	7 (63.6%)	.186	6 (100%)	13 (81.3%)	.532
Amenorrhea	11 (50%)	9 (60%)	2 (28.6%)	.361	3 (75%)	6 (54.5%)	.604
Red abdominal stretch marks	27 (60%)	21 (61.8%)	6 (54.5%)	.732	8 (88.9%)	13 (52%)	.107
Capillary fragility	16 (59.3%)	14 (73.7%)	2 (25%)	.033	7 (100%)	7 (58.3%)	.106
Acne	12 (70.6%)	9 (81.8%)	3 (50%)	.28	4 (100%)	5 (71.4%)	.491
Lower limb edema	7 (36.8%)	4 (33.3%)	3 (42.9%)	≥ .999	3 (60%)	1 (14.3%)	.222
Headache	7 (12.7%)	3 (7.3%)	4 (28.6%)	.061	0	3 (10.3%)	.543
Asthenia	28 (87.5%)	21 (87.5%)	7 (87.5%)	≥ .999	5 (83.3%)	16 (88.9%)	≥ .999
Visual defects	3 (5.5%)	1 (2.4%)	2 (14.3%)	.156	0	1 (3.4%)	≥ .999
Emotional lability	19 (82.6%)	17 (94.4%)	2 (40%)	.021	6 (100%)	11 (91.7%)	≥ .999
Depression	11 (25%)	10 (30.3%)	1 (9.1%)	.241	1 (14.4%)	9 (34.6%)	0.397
Psychosis	2 (3.3%)	2 (4.4%)	0	≥ .999	0	2 (6.1%)	≥ .999
Comorbidities							
Arterial hypertension	30 (50%)	19 (42.2%)	11 (73.3%)	.072	4 (33.3%)	15 (45.5%)	.517
Dyslipidemia	13 (21.7%)	8 (17.8%)	5 (33.3%)	.279	3 (25%)	5 (15.2%)	.661
Type 2 diabetes	17 (28.3%)	10 (22.2%)	7 (46.7%)	.064	2 (16.7%)	8 (24.2%)	.226
Osteoporosis	12 (44.4%)	11 (47.8%)	1 (25%)	.605	1 (14.3%)	10 (62.5%)	.069
Atypical fracture	5 (8.5%)	5 (11.4%)	0	.315	1 (9.1%)	4 (12.1%)	≥ .999
Infections	2 (3.4%)	1 (2.2%)	1 (7.1%)	.421	0	1 (3%)	≥ .999
Cardiovascular disease	4 (6.7%)	2 (4.4%)	2 (13.2%)	.258	0	3 (9.1%)	≥ .999
Autoimmune disease	8 (13.8%)	5 (11.4%)	3 (21.4%)	.385	1 (8.3%)	4 (12.5%)	≥ .999
Gastric ulcer	3 (5.1%)	2 (4.4%)	1 (7.1%)	.564	0	2 (6.1%)	≥ .999
Time from symptoms onset to diagnosis, mo	24 ± 35 (1-120)	24 ± 36 (1-120)	18 ± 41 (1-96)	.292	18.50 ± 49 (1-72)	36 ± 35 (6-120)	.463
Time from diagnosis to surgery, mo	162 ± 199 (21-780)	150 ± 219 (31-780)	182 ± 184.25 (21-339)	0.984	150 ± 189.5 (31-352)	178 ± 259 (40-780)	.012

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotropin; BMI, body mass index; F, female; M, male. Significant differences are highlighted in bold.

Proportions were expressed as percentages. In all analyses, *P* values less than .05 were considered statistically significant.

Results

Patient Population

Sixty patients with ACTHomas were included in this study and followed-up for a minimum of 2 years, 88.3% being female. Only 4 patients presented with cyclic CD. Demographic,

clinical, radiological, and biochemical characteristics of the patients are included in Table 1. Most cases presented with central obesity, facial plethora, full-moon face, asthenia, and emotional lability (> 80%). Hirsutism and muscular atrophy were also noteworthy (79.4% and 78.8%, respectively). The most prevalent comorbidity was hypertension (50%). Thirty four out of 60 patients (56.7%) had microadenomas (median size ± SD: microadenomas [17 ± 8.5 mm], microadenomas [6 ± 1.6 mm]).

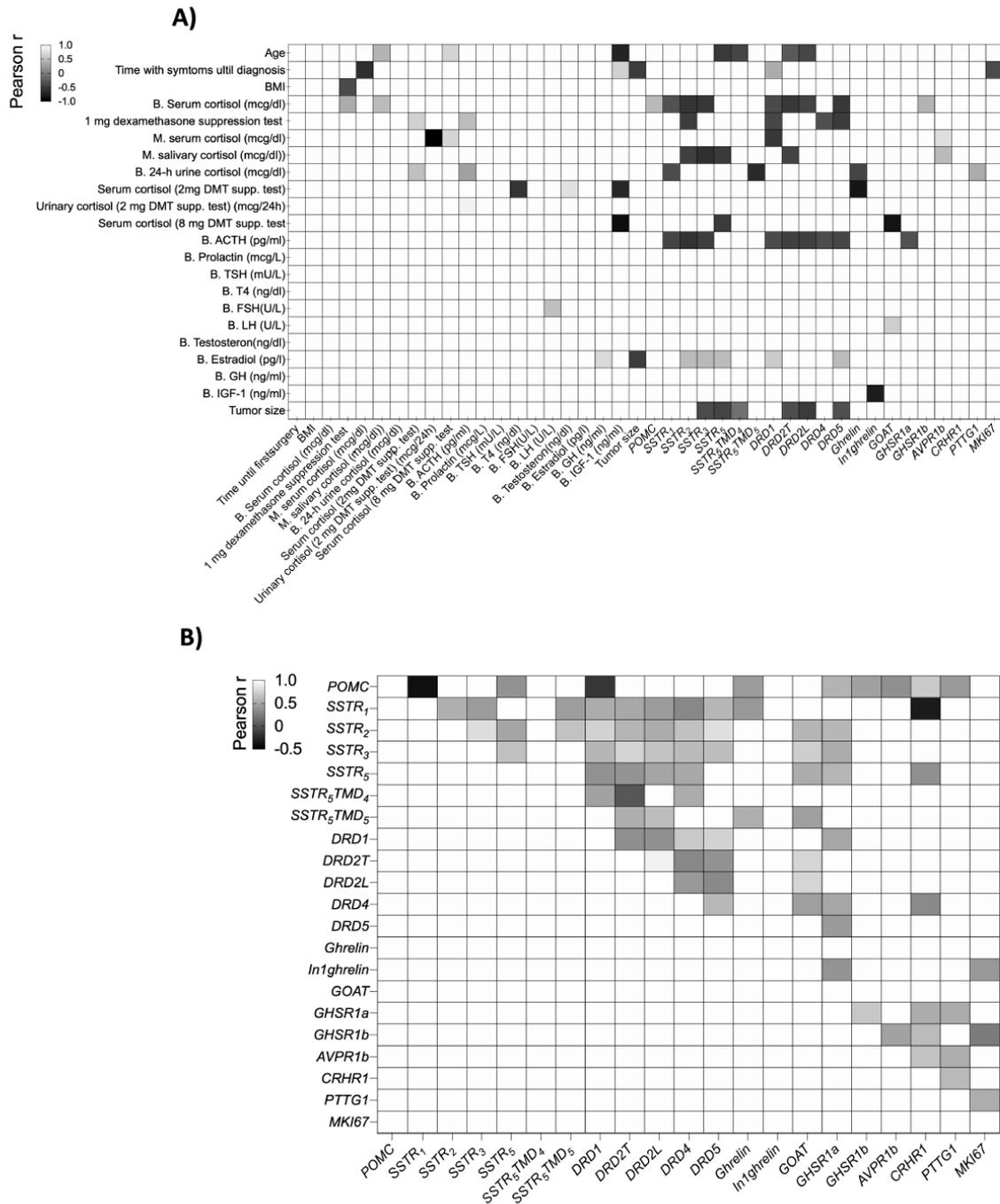


Figure 2. Clinical and molecular correlations in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumor patients. A, Correlations between clinical, biochemical, and molecular variables. B, Correlations between the expression levels of all the molecular components measured in ACTH-secreting pituitary tumors. The grayscale corresponds to the Pearson r value obtained after statistical analysis. Dark gray means “inverse correlations” and light gray means “direct correlations.”

Tumor Size, Hormone Levels, and Time Until Treatment Were Associated With Clinical Response and Long-term Follow-up of Patients With Adrenocorticotropin-secreting Pituitary Tumors

As previously mentioned, clinical response and long-term follow-up in patients with ACTHomas were estimated by

remission after surgery and the presence of recurrence, respectively. In this cohort, remission after the first surgery was reached in 45 patients out of 60. Of those 45 patients with remission, the presence of relapsed disease was reported in 12 patients (Table 3).

Patients who reached remission after first surgery presented with lower tumor size, higher baseline serum prolactin, and

lower postsurgery baseline serum cortisol (Fig. 3A). Moreover, cured patients also had lower baseline serum cortisol and 24-hour urinary cortisol levels, as well as 1-mg DST result 1 month after surgery (see Fig. 3A). In addition, cured patients presented with increased incidence of capillary fragility and emotional lability, but the incidence of comorbidities was similar in both patient groups (Tables 2 and 3).

Patients who developed recurrence presented with lower LNSC at diagnosis, lower serum TSH levels, and shorter time from diagnosis to first surgery (Fig. 3B). Baseline signs, symptoms, and comorbidities were similar in patients with or without recurrence (Table 2 and 3).

Finally, patients who were cured at the end of follow-up presented with lower tumor size, longer time with symptoms until diagnosis, longer time until first surgery, higher LNSC, but lower postsurgery cortisol and lower time until recurrence (Fig. 1C).

Expression Levels of Some Components of the Somatostatin System and *MKI67* Were Associated With Remission After First Surgery in Adrenocorticotropin-secreting Pituitary Tumors

Cured patients after the first surgery had lower expression levels of *SSTR1* compared to noncured patients (Fig. 4A). The expression levels of the other somatostatin receptor subtypes, or of the dopamine and ghrelin system components, were not associated with remission in this cohort (Fig. 4A-4C). Interestingly, increased expression of *CRHR1* and *MKI67* were observed in cured patients (Fig. 4D). Finally, we found that the expression level of *SSTR5* was increased in microadenomas compared with macroadenomas (Supplementary Fig. 1) (38).

SSTR1 Expression Levels Are Associated With Disease Recurrence in Adrenocorticotropin-secreting Pituitary Tumors

Expression levels of *SSTR1* were lower in patients who showed recurrence during follow-up (Fig. 5A). The expression levels of the other molecular components analyzed were not associated with recurrence in this study (Fig. 5A-5D).

A Combination of Clinical and Molecular Parameters Accurately Predicts Patient Remission After First Surgery

To further explore the capacity of the clinical and molecular parameters analyzed in the prediction of the outcome of CD patients, binomial logistic regression analyses were implemented. First, no clinical or molecular parameters were significantly associated with the prediction of patient recurrence (Supplementary Tables 2 and 3) (39, 40). In contrast, several molecular and clinical parameters were significantly associated with the remission of the patients (Supplementary Tables 4 and 5) (41, 42). Indeed, tumor size (odds ratio [OR]: 1.124), basal serum prolactin (OR: 0.762), postsurgery serum and urinary cortisol (OR: 1.199 and 1.20, respectively), and postsurgery 1 mg DST (OR: 1.741) were significantly associated with patient remission ($P < .05$ in all cases; see Supplementary Table 4) (41). Similarly, expression of *SSTR1* (OR: 3.052) and *CRHR1* (OR: 0.175) was significantly associated with CD patient remission ($P < .05$ in both cases; see Supplementary Table 5) (42).

Interestingly, adjusted binomial logistic regression analyses revealed that the combination of clinical and/or molecular

parameters could finely discriminate patients in remission after the first surgery (Fig. 6). In particular, a clinical model including the 2 clinical variables most significantly associated with remission (ie, tumor size and postsurgery serum cortisol) generated a ROC curve with an AUC of 0.888 (model 1; $P < .001$; see Fig. 6), while the molecular model generated with the expression of *SSTR1* and *CRHR1* resulted in a ROC curve with an AUC of 0.913 (model 2; $P < .001$; see Fig. 6). Remarkably, a clinical-molecular model combining these 2 clinical and 2 molecular parameters generated an impeccable ROC curve with an AUC of 1 (model 3; $P < .001$; see Fig. 6) for the prediction of clinical evolution and remission in patients with ACTHomas.

Discussion

Transsphenoidal pituitary surgery is the cornerstone of treatment for most patients with CD (25). However, a relevant proportion of CD patients do not achieve remission after pituitary surgery, leading to high recurrence rates on long-term follow-up (9, 10). In this context, prediction of postsurgical remission and/or recurrence in CD is a challenging goal, especially because of variable rates of remission and high risk of recurrence (43, 44). Surgical remission rates depend on tumor size and location, neurosurgeon skill and experience, and biochemical criteria used to assess remission (25). Long-term recurrence is variable in the literature, ranging from 8% to 66% (8). Several series with extended follow-up periods (≤ 20 years) report recurrence rates of even 36%, with a mean time to recurrence of 15 to 50 months (45, 46). However, preoperative clinical variables, including age, sex, disease duration, and severity of clinical signs and symptoms, have not aided in consistently identifying patients at higher risk for recurrence (1, 47).

In this study, a well-characterized multicentric cohort of CD patients ($N = 60$) served to identify clinical, biochemical, radiological, and molecular variables for predicting long-term clinical outcome and remission. Specifically, the expression levels of several key components of the hypothalamic-pituitary-corticotrophic axis were comprehensively evaluated and their associations with different key clinical, biochemical, and radiological parameters were explored. Finally, logistic regression models based on clinical and molecular data were constructed to predict long-term outcome of CD patients.

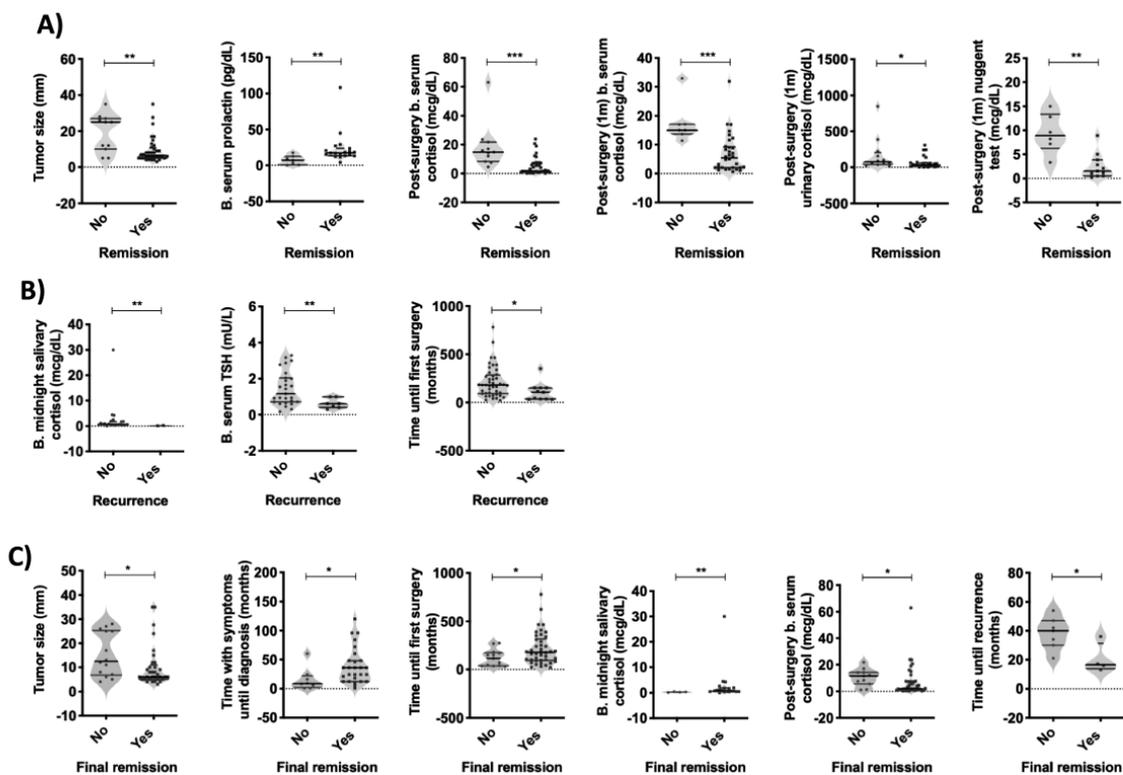
In the present cohort, tumor size was associated with remission after the first surgery and also at the end of the follow-up. This is consistent with a large series of 230 patients with ACTHomas, wherein tumor size (microadenoma) was considered only predictor of positive outcome in these patients (48). In addition, higher tumor size (macroadenomas), invasion into surrounding structures, and aggressive histological factors have been correlated with higher recurrence rates, whereas smaller tumor size and greater neurosurgical experience of the primary surgeon have been associated with lower rates of recurrence (1, 49, 50). However, a recent meta-analysis demonstrated that tumor size and macroscopic invasion were not reliable predictors of recurrence (9).

To the best of our knowledge, the biochemical severity of hypercortisolism has not been consistently studied in relation to postoperative outcomes. In our cohort, serum ACTH levels were not correlated with remission or disease recurrence. However, higher preoperative ACTH levels have been associated with lower biochemical remission rates (8). In addition, higher serum ACTH levels correlate with increased incidence

Table 3. Baseline radiological and biochemical characteristics of patients with adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors. Comparison between groups based on remission after first surgery and recurrence of disease

	Total (N = 60)	Remission after surgery (n = 45)	Nonremission after surgery (n = 15)	P	Recurrence (n = 12)	Nonrecurrence (n = 33)	P
Radiological variables							
Tumor size, mm	8 ± 10 (3-35)	8 ± 37.5 (3-35)	25 ± 17 (5-35)	.006	7 ± 6.50 (4-17)	6.5 ± 4.75 (3-35)	.831
Macroadenoma/ Microadenoma	26 (43.3 %)/34 (56.7%)	10 (27.8 %)/26 (72.2%)	9 (81.8 %)/2 (18.2%)	.002	3 (30%)/7 (70%)	7 (26.9%)/19 (73.1%)	≥ .999
Biochemical variables							
Baseline serum cortisol after 1 mg dexamethasone, µg/dL	12.64 ± 14.34 (0.34-41)	13.30 ± 14.70 (0.34-41)	11.82 ± 13.10 (4-27.60)	.670	18.50 ± 14.10 (0.34-41)	12.30 ± 14.85 (0.36-41)	.149
Presurgery baseline cortisol, µg/dL	23 ± 8.2 (7.9-71.90)	23.05 ± 7.43 (10.40-71.90)	21.30 ± 14.21 (7.90-41)	.561	23 ± 6.89 (10.87-71.90)	23.10 ± 9.53 (10.40-41)	.851
Presurgery midnight serum cortisol, µg/dL	12.60 ± 9.52 (3.55-74)	12.80 ± 9.52 (3.55-23)	12.40 ± 50.70 (8.30-74)	.522	11.10 ± 15.40 (3.55-74)	14.20 ± 11.10 (3.55-23)	.877
Presurgery LNSC, µg/dL	0.66 ± 1.36 (0.02-30)	0.80 ± 1.53 (0.02-30)	0.80 ± 1.53 (0.42-1.75)	.394	0.20 ± 0.11 (0.12-0.27)	0.85 ± 1.74 (0.02-30)	.046
Pre-surgery 24-h urinary cortisol, µg/24 h	316 ± 380.88 (21.90-3729.15)	313 ± 380.56 (21.90-3729.15)	277.42 ± 190.41 (32.40-597.60)	.075	452 ± 400.85 (161-1403.85)	317.45 ± 426.40 (21.90-3729.15)	.482
Presurgery serum ACTH, pg/mL	74.48 ± 64.80 (12-281)	78.75 ± 69 (12-281)	47.40 ± 68.80 (22-265.10)	.461	77.24 ± 71.85 (31.80-281)	78.75 ± 67.45 (12-179)	.813

Abbreviation: ACTH, adrenocorticotropin.

**Figure 3.** Clinical and biochemical associations for predicting A, remission after first surgery; B, recurrence; and C, remission after final follow-up, in patients with adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors. Data represent median (interquartile range) of each parameter analyzed. Asterisks (* $P < .05$, ** $P < .01$; *** $P < .001$) indicate statistically significant differences across groups.

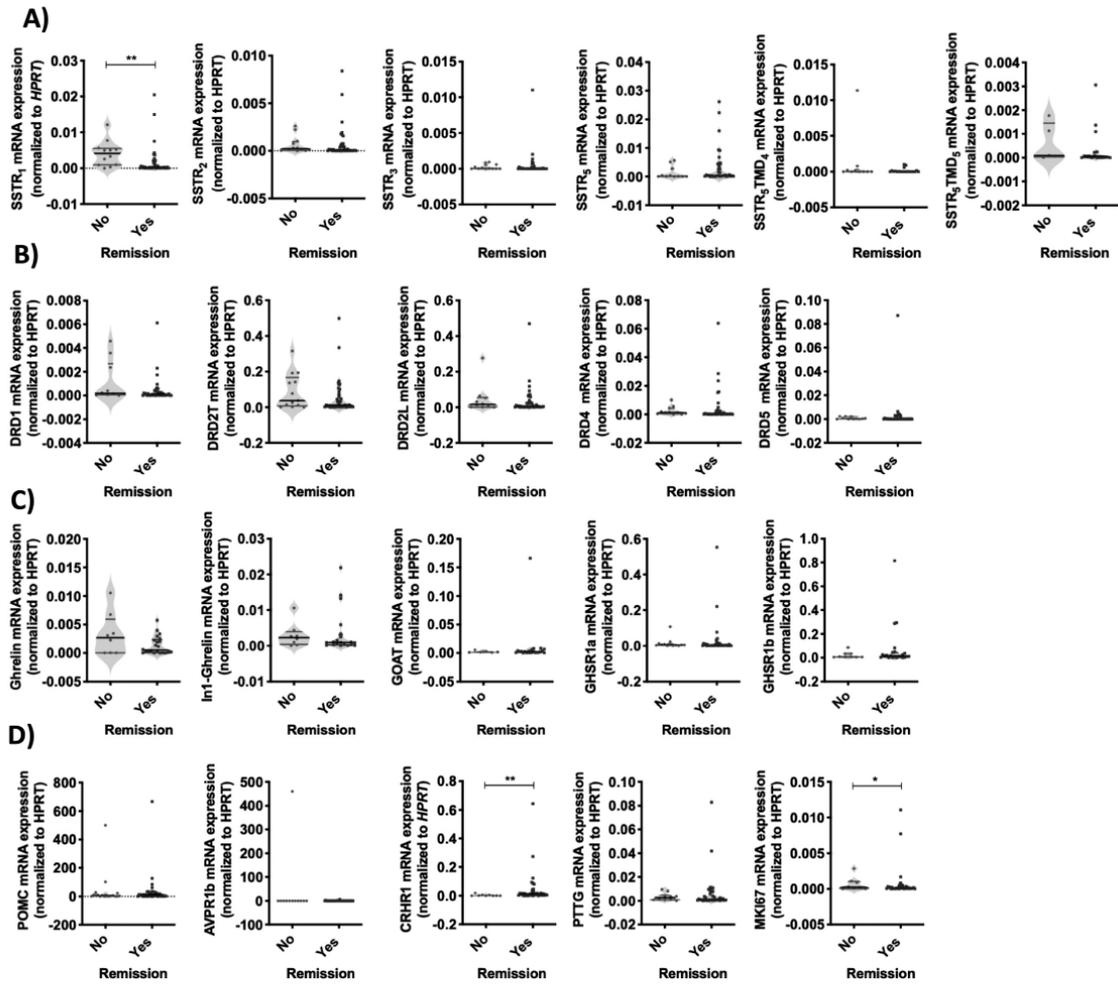


Figure 4. Molecular expression in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors of patients with and without remission. Molecular profile (determined by quantitative real-time polymerase chain reaction) of the components of the A, somatostatin; B, dopamine; and C, ghrelin systems, and D, of other key pituitary-factors and proliferation markers. Data represent median (interquartile range) of the absolute expression levels (copy number) of each transcript adjusted by the expression levels of a housekeeping gene (*HPRT1*). Asterisks (**P* < .05, ***P* < .01) indicate statistically significant differences across groups.

of CD recurrence, whereas low serum ACTH levels correlate with sustained disease remission (51, 52). Specifically, several studies consider subnormal serum ACTH values as a less sensitive marker for sustained disease remission, but they are considered as a more specific marker for long-term disease remission than subnormal serum cortisol (45, 52). Nevertheless, a cutoff value of ACTH that may predict long-term recurrence has not been determined and the data presented herein, together with previous literature, challenge the utility of biochemical severity of hypercortisolism as a predictor of postoperative outcomes.

In contrast, as observed in our cohort, a longer duration of postoperative hypocortisolism has been described as an important predictor of sustained remission (46, 53). Specifically, several studies suggest that the duration of postoperative corticoadrenal insufficiency is inversely correlated with the risk of recurrence (8). Specifically, lower

recurrence rates have been observed in patients with sub-normal postoperative cortisol levels compared with patients with normal or supranormal levels (54). Based on these studies, a consensus statement recommends immediate reevaluation of patients with persistent serum cortisol levels greater than 5 µg/dL, and careful observation of those patients with cortisol levels between 2 and 5 µg/dL (55). Nevertheless, it is important to emphasize that disease recurrence does still occur in approximately 10% of patients with low (<2 µg/dL) or even undetectable postoperative serum cortisol levels (56). There is no clear cutoff value that excludes the risk of recurrence, and some patients with elevated postoperative serum cortisol also achieve long-term remission (1, 45). Current recommendations indicate that UFC excretion measurements should be used only when serum cortisol levels are equivocal. In this case, UFC levels lower than 20 µg/24 h are suggestive of surgical remission,

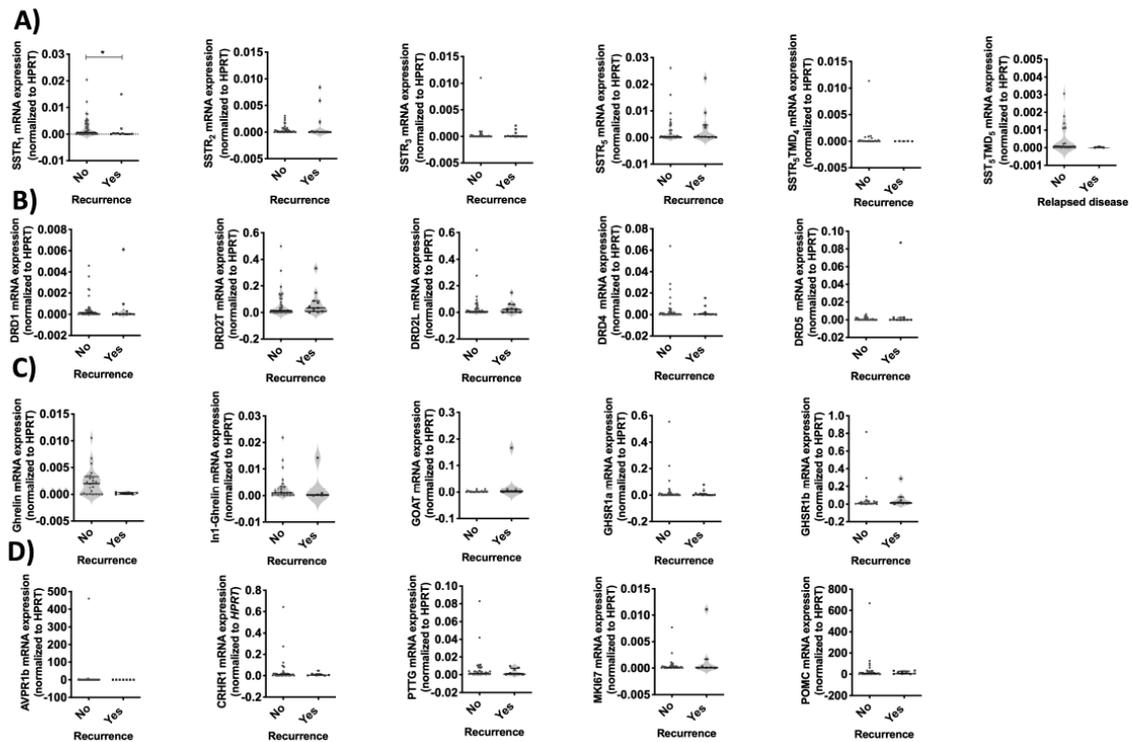


Figure 5. Molecular expression in adenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors of patients with and without recurrence. Molecular profile (determined by quantitative real-time polymerase chain reaction) of the components of the A, somatostatin; B, dopamine; and C, ghrelin systems, and D, of other key pituitary factors and proliferation markers. Data represent median (interquartile range) of the absolute expression levels (copy number) of each transcript adjusted by the expression levels of a housekeeping gene (*HPRT1*). Asterisk (* $P < .05$) indicate statistically significant differences across groups.

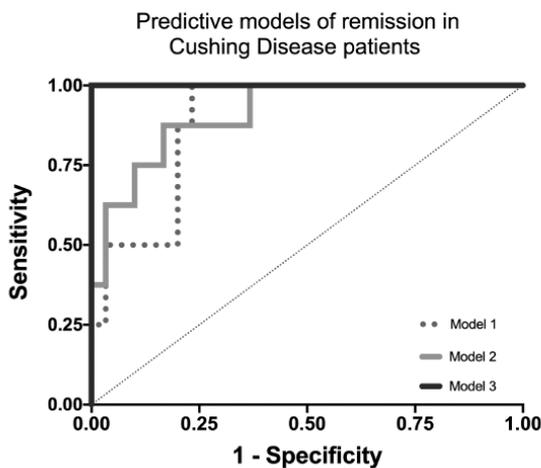


Figure 6. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of different clinical-molecular models to predict remission in patients with adenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors. Clinical models include the 2 clinical variables most significantly associated with remission (model 1: tumor size and postsurgery serum cortisol; model 2: the molecular expression of *SSTR1* and *CRHR1*; or model 3: the combination of the previous clinical variables and molecular markers).

normal UFC levels are equivocal, and elevated values suggest remaining tumor (8, 45). The LNSC has not been sufficiently validated as a useful predictor of long-term recurrence (1). In

our cohort, in contrast, only postoperative morning serum cortisol was associated with remission after first surgery, as well as at the end of follow-up (1, 44), reinforcing the prognostic potential of this marker.

Among clinical parameters, tumor size and postsurgery serum cortisol exhibited the most statistically significant associations with remission of CD patients after the first surgery (AUC = 0.888; $P < .001$). Although the data presented herein were not able to predict recurrence, machine-learning models have been used for predicting CD recurrence after 1 year of surgery (57). In this study, postoperative morning serum cortisol nadir, postoperative, and preoperative morning ACTH levels were significantly associated with recurrence (57). Furthermore, after using a random forest algorithm, age, postoperative serum cortisol, and postoperative ACTH have been considered as the best predictive variables for recurrence of CD during the first year after surgery (57). In another recent study that also used machine learning, it was suggested that sex, age, tumor detection at magnetic resonance imaging, size smaller than 10 mm, Hardy-Wilson grade, and histological confirmation of ACTH secretion, preoperative/postoperative hypopituitarism, and presurgical medical treatment might have a role in predicting long-term remission (58). Therefore, the data presented herein, together with previous evidence, suggest it may be possible to define mathematical models based on clinical parameters (especially tumor size and postsurgical serum cortisol) capable of predicting long-term outcome of CD patients, although more studies will be necessary to confirm this hypothesis.

In terms of the molecular expression of key genes belonging to the hypothalamic-pituitary-corticotrophic axis in ACTHomas, it has been previously described that *SSTR5* is one of the predominant somatostatin receptors expressed in these tumors, whereas expression levels of *SSTR2* are lower because of cortisol modulation (59-61). A similar expression pattern was observed in our cohort and represents a basis for molecular-directed therapies in CD (61). Interestingly, our data revealed that *SSTR1* is notably expressed in ACTHomas, its expression being even higher than that of *SSTR2*. Remarkably, we observed that decreased *SSTR1* expression levels were associated with remission after the first surgery. This finding might be clinically relevant in that *SSTR1* expression has been previously described in other hormone-related tumors and associated with cell proliferation and aggressiveness (62-65). These data invite the suggestion that pharmacologic treatments specifically targeting *SSTR1* might be a promising option to treat patients with ACTHomas, providing a relevant clinical conclusion, which should be tested for their use in humans.

Regarding the dopamine system, *DRD2* was the most expressed dopamine receptor in our patients, in line with previously data (66). In this context, some authors have highlighted that the expression of *DRD2* is correlated with the clinical response to dopamine agonists of some pituitary tumor types (67). However, our study showed no association between the expression of DRDs and clinical outcome, which is consistent with recent findings in nonfunctioning pituitary tumors (68). In addition, it is also established that ghrelin stimulates ACTH and cortisol secretion under normal conditions, and this regulation is accompanied by negative glucocorticoid feedback. This stimulatory effect persists in patients with CD (69, 70), and even in patients with ectopic ACTH-secreting tumors, in which an ACTH hyperresponsiveness to ghrelin has been described (70). In this context, the expression levels of some components of the ghrelin system were also evaluated in our cohort. Specifically, ghrelin and ghrelin-receptors (*GHSR1a* and *GHSR1b*) were correlated with *POMC*, which is in line with other publications indicating that ghrelin excites *POMC* neurons through an unidentified mechanism and stimulates ACTH secretion in ACTHomas (31, 71). In this context, previous publications have described an increased expression of the splicing variant In1-ghrelin in pituitary tumors, wherein it is associated with aggressive features, and its silencing was accompanied by reduced cell proliferation in pituitary primary cultures (31). In our cohort, the expression of In1-ghrelin variant was directly correlated with *MKI67* in ACTHomas, suggesting an association with proliferation markers. Moreover, the *GOAT* enzyme was strongly correlated with the expression of key somatostatin and dopamine receptors (eg, *SSTR2*, *SSTR5*, and *DRD2*) as has been reported in other neuroendocrine tumors (72). Finally, the truncated receptor *GHSR1b* also demonstrated significant correlations including with *CRHR1* and *PTTG1*, which should be further investigated.

In recent years, systematical evaluation of *MKI67* in pituitary tumors has been a matter of debate (73). Several clinical studies have described the association between *MKI67* and clinical features in pituitary tumors, including invasion characteristics, tumor size, risk of recurrence, and growth rate, but despite this, results are contradictory (74). In ACTHomas, *MKI67* seems to be increased in tumors larger than 1 cm and related to lower long-term tumor remission rate (75-77).

Another study has suggested that *Ki67* levels greater than 4% (evaluated by immunohistochemistry) and ACTH serum values above 40 ng/mL 1 month after surgery were associated with the absence of biochemical control in these patients (78). In our cohort, *MKI67* expression was not associated with remission, recurrence, or tumor size, but it was correlated with expression of In1-ghrelin and *GHSR1b*, 2 splicing variants that have been previously reported to be overexpressed in different pituitary tumors, including ACTHomas, and play a pathophysiological role in this pituitary tumor type (31). Interestingly, we found that *PTTG1* expression levels were significantly higher than *MKI67* in ACTHomas. *PTTG1* has been associated with increased invasion capacity of pituitary tumors (79), and recently, it has been associated with invasiveness, age, and female sex in nonfunctioning pituitary tumors (80). In our cohort of CD patients, *PTTG1* was correlated with the expression of *POMC*, *AVPR1b*, and *CRHR1*. This correlation might be pathophysiologically relevant because we have demonstrated that *AVPR1b* is overexpressed in ACTHomas, wherein it might exert an important functional role since its levels are directly correlated with elevated plasma ACTH levels in CD patients and might be a responsible factor for the direct desmopressin stimulatory effects in CD patients (27).

Finally, binomial logarithmic regression studies further supported the overall alterations and key associations/correlations observed in our cohort of CD patients. Although we could not identify any robust singular clinical or molecular parameter that was significantly associated with the prediction of the recurrence of CD patients, our analyses identified some molecular (ie, *SSTR1* and *CRHR1*) and clinical (ie, tumor size, basal serum prolactin, postsurgery serum and urinary cortisol, and postsurgery 1 mg DST) parameters that were significantly associated with patient remission. Most important, we demonstrated that a model combining the 2 clinical variables that were found to be the most significantly associated with remission (ie, tumor size and postsurgery serum cortisol; prediction model 1 in Fig. 6) together with the molecular markers identified (ie, *SSTR1* and *CRHR1*; prediction model 2 in Fig. 6) could better improve the predictive capacity of both individual models in that the ROC curve analysis based on tumor size, postoperative serum cortisol, and *SSTR1* and *CRHR1* expression levels could perfectly discriminate between patients in remission and nonremission patients after the first surgery (predictive model 3: ROC curve with AUC = 1). To the best of our knowledge, this is the first study showing a clinical-molecular-based algorithm capable of identifying patients with CD at different risks of being in remission or not after their first surgery, a prediction that has been a challenging goal to date for clinicians managing patients with CD. At this point, it is interesting to mention that a recent systematic review including a relevant number of CD patients from 5 different cohorts revealed that the probability of remission was found to be higher in patients with the somatic *USP8*-mutated allele vs patients with the *USP8*-wild-type allele (11). Therefore, it would be interesting to perform in the future multicenter analyses to evaluate whether the analysis of the mutational status of *USP8* together with the molecular and clinical parameters identified in this study (ie, expression of *SSTR1/CRHR1*, tumor size, and postoperative serum cortisol) could accurately predict the remission of patients with CD after first surgery. Nevertheless, we should also mention that a limitation of our study might be that mRNA levels may

not always directly translate into functional protein levels; however, several studies analyzing the correspondence between mRNA and protein state, using transcriptomic and proteomic technologies, have revealed that the abundance of an mRNA is often an excellent proxy for the presence of a protein (81, 82).

Altogether, our results suggest that the molecular analysis of ACTHomas could represent a valuable, complementary tool for improving the understanding of the pathophysiology of ACTHomas. Future studies should be conducted in larger cohorts and with patients of different ethnicities to appropriately corroborate our main conclusions. Nevertheless, this study reveals that the expression of 2 molecular determinants, *SSTR1* and *CRHR1*, also help to predict, together with some key clinical parameters, tumor behavior of patients with CD.

Financial Support

This work was supported by the Junta de Andalucía (Nos. P20_00442, PEER-0048-2020, A-0006-2017, A-0055-2018, C-0015-2014, RC-0006-2018; postdoctoral grant DOC_01584, and BIO-0139); Ministry of Science and Innovation (Nos. PID2019-105564RB-I00 and PID2019-105201RB-I00); Instituto de Salud Carlos III, cofunded by the European Union (ERDF/ESF, "Investing in your future"; Nos. PI13/02043; PI16/00175, PI21/01012, and Sara Borrell programme CD19/00255); Spanish Ministry of Universities (predoctoral contract FPU16-05059); a GETNE2019 research grant; and CIBERobn. CIBER is an initiative of Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Spain.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Data Availability

Some or all data generated or analyzed during this study are included in this published article or in the data repositories listed in "References."

References

- Abellán Galiana P, Fajardo Montañana C, Riesgo Suárez PA, Gómez Vela J, Escrivá CM, Lillo VR. Predictors of long-term remission after transphenoidal surgery in Cushing's disease [article in Spanish]. *Endocrinol Nutr*. 2013;60(8):475-482.
- Ragnarsson O, Olsson DS, Papakokkinou E, et al. Overall and disease-specific mortality in patients with Cushing disease: a Swedish nationwide study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(6):2375-2384.
- Hinojosa-Amaya JM, Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. Medical management of Cushing's syndrome: current and emerging treatments. *Drugs*. 2019;79(9):935-956.
- Hakami OA, Ahmed S, Karavitaki N. Epidemiology and mortality of Cushing's syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2021;35(1):101521.
- van Haalen FM, Broersen LHA, Jorgensen JO, Pereira AM, Dekkers OM. Management of endocrine disease: mortality remains increased in Cushing's disease despite biochemical remission: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2015;172(4):R143-R149.
- Sharma ST, Nieman LK, Feelders RA. Comorbidities in Cushing's disease. *Pituitary*. 2015;18(2):188-194.
- Feelders RA, Hofland LJ. Medical treatment of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):425-438.
- Ioachimescu AG. Prognostic factors of long-term remission after surgical treatment of Cushing's disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2018;47(2):335-347.
- Roelfsema F, Biermasz NR, Pereira AM. Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis. *Pituitary*. 2012;15(1):71-83.
- Swearingen B. Update on pituitary surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(4):1073-1081.
- Wanichi IQ, de Paula Mariani BM, Frassetto FP, et al. Cushing's disease due to somatic USP8 mutations: a systematic review and meta-analysis. *Pituitary*. 2019;22(4):435-442.
- Bression D, Brandi AM, Noursbaum A, Le Dafniet M, Racadot J, Peillon F. Evidence of dopamine receptors in human growth hormone (GH)-secreting adenomas with concomitant study of dopamine inhibition of GH secretion in a perfusion system. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;55(3):589-593.
- Neto LV, de O Machado E, Luque RM, et al. Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical response to octreotide-LAR in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(6):1931-1937.
- Venegas-Moreno E, Vázquez-Borrego MC, Dios E, et al. Association between dopamine and somatostatin receptor expression and pharmacological response to somatostatin analogues in acromegaly. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):1640-1649.
- de Herder WW, Reijs AE, de Swart J, et al. Comparison of iodine-123 epidepride and iodine-123 IBZM for dopamine D2 receptor imaging in clinically non-functioning pituitary macroadenomas and macroprolactinomas. *Eur J Nucl Med*. 1999;26(1):46-50.
- Bevan JS, Burke CW. Non-functioning pituitary adenomas do not regress during bromocriptine therapy but possess membrane-bound dopamine receptors which bind bromocriptine. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1986;25(5):561-572.
- Taboada GF, Luque RM, Bastos W, et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*. 2007;156(1):65-74.
- Casarini AP, Jallad RS, Pinto EM, et al. Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary*. 2009;12(4):297-303.
- Wildemberg LE, Neto LV, Costa DF, et al. Low somatostatin receptor subtype 2, but not dopamine receptor subtype 2 expression predicts the lack of biochemical response of somatotropinomas to treatment with somatostatin analogs. *J Endocrinol Invest*. 2013;36(1):38-43.
- Iacovazzo D, Carlsen E, Lugli F, et al. Factors predicting pasireotide responsiveness in somatotroph pituitary adenomas resistant to first-generation somatostatin analogues: an immunohistochemical study. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(2):241-250.
- Fleseriu M, Auchus R, Bancos I, et al. Consensus on diagnosis and management of Cushing's disease: a guideline update. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2021;9(12):847-875.
- Hinojosa-Amaya JM, Cuevas-Ramos D. The definition of remission and recurrence of Cushing's disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2021;35(1):101485.
- Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):1526-1540.
- Guignat L, Bertherat J. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline: commentary from a European perspective. *Eur J Endocrinol*. 2010;163(1):9-13.
- Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, et al. Treatment of Cushing's syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(8):2807-2831.

26. Vázquez-Borrego MC, Gupta V, Ibáñez-Costa A, *et al.* A somatostatin receptor subtype-3 (SST3) peptide agonist shows antitumor effects in experimental models of nonfunctioning pituitary tumors. *Clin Cancer Res.* 2020;26(4):957-969.
27. Luque RM, Ibáñez-Costa A, López-Sánchez LM, *et al.* A cellular and molecular basis for the selective desmopressin-induced ACTH release in Cushing disease patients: key role of AVPR1b receptor and potential therapeutic implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):4160-4169.
28. Luque RM, Ibáñez-Costa A, Sánchez-Tejada L, *et al.*; Investigadores de REMAH. The Molecular Registry of Pituitary Adenomas (REMAH): a bet of Spanish Endocrinology for the future of individualized medicine and translational research. *Endocrinol Nutr.* 2016;63(6):274-284.
29. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol.* 2012;80(1):75-84.
30. Leal-Cerro A, Martín-Rodríguez JF, Ibáñez-Costa A, *et al.* Desmopressin test in the diagnosis and follow-up of cyclical Cushing's disease. *Endocrinol Nutr.* 2014;61(2):69-76.
31. Ibáñez-Costa A, Gahete MD, Rivero-Cortés E, *et al.* In1-ghrelin splicing variant is overexpressed in pituitary adenomas and increases their aggressive features. *Sci Rep.* 2015;5:8714.
32. Puig-Domingo M, Soto A, Venegas E, *et al.*; ACROCOMB Study Group. Use of lanreotide in combination with cabergoline or pegvisomant in patients with acromegaly in the clinical practice: the ACROCOMB study. *Endocrinol Nutr.* 2016;63(8):397-408.
33. Alhambra-Expósito MR, Ibáñez-Costa A, Moreno-Moreno P, *et al.* Association between radiological parameters and clinical and molecular characteristics in human somatotropinomas. *Sci Rep.* 2018;8(1):6173.
34. García-Martínez A, Fuentes-Fayos AC, Fajardo C, *et al.* Differential expression of microRNAs in silent and functioning corticotroph tumors. *J Clin Med.* 2020;9(6):1838.
35. Durán-Prado M, Gahete MD, Martínez-Fuentes AJ, *et al.* Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(7):2634-2643.
36. Luque RM, Ibáñez-Costa A, Neto LV, *et al.* Truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 confers aggressive features (proliferation, invasion and reduced octreotide response) to somatotropinomas. *Cancer Lett.* 2015;359(2):299-306.
37. Moreno-Moreno P, Ibáñez-Costa A, Venegas-Moreno E, *et al.* Supplementary Table 1 for "Integrative clinical, radiological, and molecular analysis for predicting remission and recurrence of Cushing disease." Deposited February 14, 2022. doi:10.6084/m9.figshare.19168430
38. Moreno-Moreno P, Ibáñez-Costa A, Venegas-Moreno E, *et al.* Supplementary Figure 1 for "Integrative clinical, radiological, and molecular analysis for predicting remission and recurrence of Cushing disease." Deposited February 14, 2022. doi:10.6084/m9.figshare.19168430
39. Moreno-Moreno P, Ibáñez-Costa A, Venegas-Moreno E, *et al.* Supplementary Table 2 for "Integrative clinical, radiological, and molecular analysis for predicting remission and recurrence of Cushing disease." Deposited February 14, 2022. doi:10.6084/m9.figshare.19168430
40. Moreno-Moreno P, Ibáñez-Costa A, Venegas-Moreno E, *et al.* Supplementary Table 3 for "Integrative clinical, radiological, and molecular analysis for predicting remission and recurrence of Cushing disease." Deposited February 14, 2022. doi:10.6084/m9.figshare.19168430
41. Moreno-Moreno P, Ibáñez-Costa A, Venegas-Moreno E, *et al.* Supplementary Table 4 for "Integrative clinical, radiological, and molecular analysis for predicting remission and recurrence of Cushing disease." Deposited February 14, 2022. doi:10.6084/m9.figshare.19168430
42. Moreno-Moreno P, Ibáñez-Costa A, Venegas-Moreno E, *et al.* Supplementary Table 5 for "Integrative clinical, radiological, and molecular analysis for predicting remission and recurrence of Cushing disease." Deposited February 14, 2022. doi:10.6084/m9.figshare.19168430
43. Chandler WF, Barkan AL, Hollon T, *et al.* Outcome of transphenoidal surgery for Cushing disease: a single-center experience over 32 years. *Neurosurgery.* 2016;78(2):216-223.
44. Ciric I, Zhao JC, Du H, *et al.* Transphenoidal surgery for Cushing disease: experience with 136 patients. *Neurosurgery.* 2012;70(1):70-80; discussion 80-81.
45. Pendharkar AV, Sussman ES, Ho AL, Hayden Gephart MG, Katznelson L. Cushing's disease: predicting long-term remission after surgical treatment. *Neurosurg Focus.* 2015;38(2):E13.
46. Alexandraki KI, Kaltsas GA, Isidori AM, *et al.* Long-term remission and recurrence rates in Cushing's disease: predictive factors in a single-centre study. *Eur J Endocrinol.* 2013;168(4):639-648.
47. Ayala A, Manzano AJ. Detection of recurrent Cushing's disease: proposal for standardized patient monitoring following transphenoidal surgery. *J Neurooncol.* 2014;119(2):235-242.
48. Cebula H, Baussart B, Villa C, *et al.* Efficacy of endoscopic endonasal transphenoidal surgery for Cushing's disease in 230 patients with positive and negative MRI. *Acta Neurochir (Wien).* 2017;159(7):1227-1236.
49. Hameed N, Yedinak CG, Brzana J, *et al.* Remission rate after transphenoidal surgery in patients with pathologically confirmed Cushing's disease, the role of cortisol, ACTH assessment and immediate reoperation: a large single center experience. *Pituitary.* 2013;16(4):452-458.
50. Lambert JK, Goldberg L, Fayngold S, Kostadinov J, Post KD, Geer EB. Predictors of mortality and long-term outcomes in treated Cushing's disease: a study of 346 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):1022-1030.
51. Salmon PM, Loftus PD, Dodd RL, Harsh G, Chu OS, Katznelson L. Utility of adrenocorticotrophic hormone in assessing the response to transphenoidal surgery for Cushing's disease. *Endocr Pract.* 2014;20(11):1159-1164.
52. Lindsay JR, Oldfield EH, Stratakis CA, Nieman LK. The postoperative basal cortisol and CRH tests for prediction of long-term remission from Cushing's disease after transphenoidal surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):2057-2064.
53. Bansal P, Lila A, Goroshi M, *et al.* Duration of post-operative hypocortisolism predicts sustained remission after pituitary surgery for Cushing's disease. *Endocr Connect.* 2017;6(8):625-636.
54. Abu Dabrh AMA, Singh Ospina NM, Al Nofal A, *et al.* Predictors of biochemical remission and recurrence after surgical and radiation treatments of Cushing disease: a systematic review and meta-analysis. *Endocr Pract.* 2016;22(4):466-475.
55. Biller BM, Grossman AB, Stewart PM, *et al.* Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(7):2454-2462.
56. Krikorian A, Abdelmannan D, Selman WR, Arafah BM. Cushing disease: use of perioperative serum cortisol measurements in early determination of success following pituitary surgery. *Neurosurg Focus.* 2007;23(3):E6.
57. Liu Y, Liu X, Hong X, *et al.* Prediction of recurrence after transphenoidal surgery for Cushing's disease: the use of machine learning algorithms. *Neuroendocrinology.* 2019;108(3):201-210.
58. Zoli M, Staartjes VE, Guaraldi F, *et al.* Machine learning-based prediction of outcomes of the endoscopic endonasal approach in Cushing disease: is the future coming? *Neurosurg Focus.* 2020;48(6):E5.
59. Hofland LJ. Somatostatin and somatostatin receptors in Cushing's disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;286(1-2):199-205.
60. Ben-Shlomo A, Schmid H, Wawrowsky K, *et al.* Differential ligand-mediated pituitary somatostatin receptor subtype signaling: implications for corticotroph tumor therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4342-4350.

61. Langlois F, Chu J, Fleseriu M. Pituitary-directed therapies for Cushing's disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:164.
62. Pedraza-Arévalo S, Hormaechea-Agulla D, Gómez-Gómez E, et al. Somatostatin receptor subtype 1 as a potential diagnostic marker and therapeutic target in prostate cancer. *Prostate*. 2017;77(15):1499-1511.
63. Zatelli MC, Tagliati F, Piccin D, et al. Somatostatin receptor subtype 1-selective activation reduces cell growth and calcitonin secretion in a human medullary thyroid carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297(4):828-834.
64. Zatelli MC, Piccin D, Tagliati F, et al. Somatostatin receptor subtype 1 selective activation in human growth hormone (GH)- and prolactin (PRL)-secreting pituitary adenomas: effects on cell viability, GH, and PRL secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(6):2797-2802.
65. Ishihara S, Hassan S, Kinoshita Y, et al. Growth inhibitory effects of somatostatin on human leukemia cell lines mediated by somatostatin receptor subtype 1. *Peptides*. 1999;20(3):313-318.
66. de Bruin C, Feelders RA, Lamberts SW, Hofland LJ. Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2009;10(2):91-102.
67. Pivonello R, Matrone C, Filippella M, et al. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(4):1674-1683.
68. Flores-Martínez Á, Venegas-Moreno E, Dios E, et al. Quantitative analysis of somatostatin and dopamine receptors gene expression levels in non-functioning pituitary tumors and association with clinical and molecular aggressiveness features. *J Clin Med*. 2020;9(9):3052.
69. Miljić D, Polovina S, Doknić M, et al. Combined administration of ghrelin and corticotropin-releasing hormone in the diagnosis of Cushing's disease. *Neuroendocrinology*. 2017;104(1):33-39.
70. Giordano R, Picu A, Broglio F, et al. Ghrelin, hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and Cushing's syndrome. *Pituitary*. 2004;7(4):243-248.
71. Chen SR, Chen H, Zhou JJ, et al. Ghrelin receptors mediate ghrelin-induced excitation of agouti-related protein/neuropeptide Y but not pro-opiomelanocortin neurons. *J Neurochem*. 2017;142(4):512-520.
72. Herrera-Martínez AD, Gahete MD, Sánchez-Sánchez R, et al. Ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) enzyme as a novel potential biomarker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018;9(10):196.
73. Chanson P, Raverot G, Castinetti F, Cortet-Rudelli C, Galland F, Salenave S; French Endocrinology Society non-functioning pituitary adenoma work-group. Management of clinically non-functioning pituitary adenoma. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2015;76(3):239-247.
74. Guadagno E, D'Avella E, Cappabianca P, Colao A, Del Basso De Caro M. Ki67 in endocrine neoplasms: to count or not to count, this is the question! A systematic review from the English language literature. *J Endocrinol Invest*. 2020;43(10):1429-1445.
75. Turner HE, Nagy Z, Esiri MM, Wass JA. The enhanced peroxidase one step method increases sensitivity for detection of Ki-67 in pituitary tumours. *J Clin Pathol*. 1999;52(8):624-626.
76. Keskin FE, Ozkaya HM, Bolayirli M, et al. Outcomes of primary transsphenoidal surgery in Cushing disease: experience of a tertiary center. *World Neurosurg*. 2017;106:374-381.
77. Losa M, Barzaghi RL, Mortini P, et al. Determination of the proliferation and apoptotic index in adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors: comparison between micro- and macroadenomas. *Am J Pathol*. 2000;156(1):245-251.
78. Liu X, Feng M, Zhang Y, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9, pituitary tumor transforming gene, high mobility group A 2, and Ki-67 in adrenocorticotropin hormone-secreting pituitary tumors and their association with tumor recurrence. *World Neurosurg*. 2018;113:e213-e221.
79. Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis. *Clin Med Res*. 2006;4(2):130-137.
80. Trott G, Ongaratti BR, de Oliveira Silva CB, et al. PTTG overexpression in non-functioning pituitary adenomas: correlation with invasiveness, female gender and younger age. *Ann Diagn Pathol*. 2019;41:83-89.
81. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):227-232.
82. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol*. 2011;7:548.

Paloma Moreno Moreno

Tesis doctoral

15 de Mayo 2022

