

Proyecto de Investigación

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS EN NIÑOS Y ADOLESCENTES

Dra. Itxaso Rica – Dr. Luis Castaño

RESUMEN (Objetivos y Metodología del Proyecto)

Los adenomas hipofisarios en pacientes pediátricos son una patología rara de la que se desconoce la prevalencia. Presentan unas características clínicas y moleculares singulares y a menudo asocian alteraciones genéticas en línea germinal, siendo la más frecuente mutaciones en el gen *AIP* y menos frecuentes alteraciones en *MEN1*, *GNAS*, *CDKN1* y *PRKAR1A*.

Objetivo: Caracterización clínica y molecular mediante análisis en línea germinal, de pacientes pediátricos con adenomas hipofisarios.

Pacientes y Métodos: Estudio Retrospectivo y prospectivo que incluirá pacientes con adenomas hipofisarios familiares o esporádicos, diagnosticados antes de los 20 años y sus familiares de primer grado, controlados en los servicios de Endocrinología Pediátrica /Endocrinología de los principales hospitales de España. Se recogerán datos clínicos al diagnóstico y de la evolución clínica de los pacientes. El análisis molecular se realizará a partir de ADN genómico obtenido de sangre periférica y se procederá a la secuenciación masiva de los 5 genes mencionados. Las variantes detectadas mediante el análisis bioinformático se comprobarán en las bases de datos disponibles para distinguir las nuevas mutaciones de aquellos polimorfismos comunes no patogénicos. Cada variante encontrada será estudiada mediante PCR y secuenciación Sanger, y se validará en los pacientes y sus padres con el fin de dilucidar si se trata de una mutación *de novo* o heredada. Con los datos clínicos y genéticos se establecerán las posibles correlaciones genotipo/fenotipo de esta enfermedad.

El tratamiento de esta patología es multidisciplinar. Un diagnóstico clínico temprano y un screening genético adecuado, permitirían instaurar un procedimiento terapéutico eficaz y abordar el asesoramiento genético en estas familias.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS.

Los adenomas hipofisarios son uno de los tumores intracraneales más frecuentes, con una prevalencia de 1/1000 habitantes. A pesar de ser cuadros benignos (adenomas) debido a la disfunción neuroendocrina y a la ocupación de espacio producen importante morbilidad, asociada a un alto coste en el manejo y en el seguimiento. A nivel pediátrico, aunque se desconoce la prevalencia, es una patología rara (se piensa que entre el 3-8% de los tumores hipofisarios se diagnostican antes de los 20 años) y supone el 3% de los tumores intracraneales en el niño.

La mayor parte de los adenomas hipofisarios son esporádicos, sin historia familiar, sin embargo casos familiares y casos esporádicos de comienzo precoz (infancia y adolescencia) pueden estar asociados a formas hereditarias. Así, un tumor hipofisario puede ser la manifestación de alteraciones genéticas en la neoplasia endocrina múltiple (MEN tipo 1 o tipo 4), en el Complejo de Carney o el Síndrome de McCune Albright.

Desde un punto de vista clínico son más prevalentes en mujeres, y en función de la secreción hormonal que predomine pueden ser somatotropinomas, prolactinomas, tumores secretores de TSH o ACTH, multisecretores o no funcionantes (NFPA). Por su tamaño, pueden ser microadenomas (<10mm de diámetro) o macroadenomas (>10mm). En las formas familiares, pueden ser homogéneos (cuando todos los miembros de la familia tienen el mismo tipo celular) o heterogéneos (cuando tienen diferente tipo celular). Los prolactinomas o los somatotropinomas son los tumores más frecuentes (en edad pediátrica suponen el 50% y 20% respectivamente), mientras que los gonadotropinomas, corticotropinomas y tirotropinomas son más raros. Las formas no secretantes (13%) suelen ser clínicamente más agresivas.

El tratamiento de los adenomas hipofisarios es multidisciplinar e incluye neurocirugía, radioterapia y tratamiento farmacológico y cuanto antes se diagnostique (menor tamaño) existen mayores posibilidades de curación.

Generalmente los adenomas hipofisarios son expansiones clonales de una línea celular y estudios moleculares han identificado asociación a alteraciones genéticas y epigenéticas. Estas alteraciones incluyen mutaciones somáticas en el oncogén *gsp*, sobreexpresión de gen PTTG (*pituitary tumor transforming gene*) y raramente mutaciones de oncogenes clásicos. También, adenomas hipofisarios se pueden desarrollar por alteraciones en mutaciones activadoras somáticas en el gen *GNAS* (el 30-40% de los tumores productores de GH).

Por otra parte, mutaciones en línea germinal se han asociado a alteraciones en el gen de la menina (*MEN1*), en *CDKN1B*, que codifica para *p27* (*MEN4*), en el gen *PRKARIA* (60% de los pacientes con Complejo de Carney) o alteraciones asociadas al síndrome de McCune Albright. Más raramente, mutaciones en *SDH* se asocian a forma familiares de paraganglioma, feocromocitoma y adenoma hipofisario (prolactinomas en el caso de alteraciones *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*), o tumores no secretores o gigantismo en mutaciones en *SDHB*. Asimismo, mutaciones en *DICER1*, un gen que regula microARN, puede causar tumores hipofisarios productores de ACTH de comienzo pediátrico.

Recientemente se observado que el 25% de los adenomas hipofisarios aislados familiares (FIPA), la mayoría de ellos de comienzo en la infancia o adolescencia (40% de los tumores a esta edad) se asocian con mutaciones en el gen *AIP* (*hydrocarbon receptor interacting protein*). La mayoría de los tumores FIPA, se asocian con somatotropinomas, aunque también pueden ser tumores productores de prolactina y más raramente productores de ACTH o TSH.

Mutaciones en *AIP* se detectan en 20% de los niños con adenomas hipofisarios aislados (sin antecedentes personales) y en el 11% de los macroadenomas en menores de los 40 años. A pesar de la distribución de la proteína *AIP* en otros tejidos, no se han identificado en portadores de mutaciones tumores en otras localizaciones, ya que aunque se han asociado otros tumores, la amplia presencia de estos en la población general no ha permitido relación causa/efecto con la mutación. El *AIP* es un gen supresor de tumores pero el mecanismo exacto no está claro, y en el 75% de los casos la mutación (alteración en secuencia en el 90% y delección por MLPA en el 10 %) produce una proteína truncada. En el caso de mutaciones *missense*, generalmente ésta afecta la región C terminal. Estas alteraciones son Autosómico-Dominantes, pero de penetrancia incompleta. Así, la penetrancia en familias *AIP* positivas es variable con una media de 15 -30% (rango 10 -80%).

No está clara una relación genotipo/fenotipo, pero desde el punto de vista clínico, los adenomas hipofisarios con mutación en *AIP* tienen unas características diferenciales, siendo de mayor predominio en varones y frecuentemente productores de GH (cerca del 80% de los pacientes) o de prolactina (50% de los pacientes). Asimismo, son tumores mucho más agresivos y de comienzo más precoz a menudo en edad pediátrica. Así, macroadenomas invasivos se manifiestan fundamentalmente en niños y adolescentes (clínica de Gigantismo) en más de la mitad de los pacientes con mutación en el *AIP*.

Por otra parte, el control de estos tumores es difícil ya que son malos respondedores a los análogos de somatostatina y tienen una evolución tórpida.

Asimismo, prolactinomas con mutaciones en el *AIP* tienen un mayor tamaño, son más invasivos y son resistentes a los agonistas de la dopamina en el 50%, siendo necesaria la cirugía o la radioterapia.

Con respecto a la herencia, los descendientes de familias FIPA suelen tener tumores de presentación más temprana que sus padres o abuelos y datos recientes muestran que el 20% de los hijos de pacientes con acromegalia portan mutación en el *AIP*. En casos de mutación en *AIP* el 50% de los hijos heredarán la mutación y el screening genético se debería hacer no más tarde de los 4 años, fundamentalmente en aquellos macroadenomas productores de GH y de PRL (se han diagnosticado macroadenomas productores de GH y gigantismo a partir de los 6-8 años).

En resumen, los adenomas hipofisarios en la infancia, aunque es una patología rara, presentan unas características moleculares y clínicas singulares. A menudo se asocian con alteraciones genéticas, siendo la más frecuente mutaciones en el *AIP*, además de alteraciones en *MEN1*, *GNAS*, *CDKN1B*, *PRKARIA*, etc,... En el caso de mutaciones en *AIP*, son a menudo clínicamente más agresivos (macroadenomas) y con una evolución tórpida (resistentes a tratamiento farmacológico y necesidad de cirugía de repetición). En este sentido, es importante un diagnóstico temprano y un screening genético en las formas hereditarias de cara a instaurar un tratamiento eficaz, en función de las características genéticas (y consecuentemente clínicas). No existen grandes series de esta patología que permitan definir algunos de estos aspectos.

El presente proyecto persigue la caracterización clínica y molecular de tumores hipofisarios en la infancia y adolescencia con el fin de establecer los criterios clínicos de actuación.

HIPÓTESIS DEL ESTUDIO.

Los tumores hipofisarios en la infancia y adolescencia tienen un fenotipo singular que puede ser caracterizado por su etiología genética, a menudo su evolución es tórpida y su diagnóstico tardío. Son frecuentes los macroadenomas que se caracterizan por la necesidad de tratamiento quirúrgico en los somatotropinomas y una mala respuesta farmacológica en el caso de los prolactinomas. Existe una relación genotipo- fenotipo. Un diagnóstico precoz, de tipo genético puede facilitar un control clínico más eficaz.

OBJETIVOS.

Objetivo principal:

Caracterización clínica y molecular de tumores hipofisarios en niños y adolescentes en España.

Objetivos parciales:

- 1.- Caracterización clínica de tumores hipofisarios al diagnóstico y en evolución.
- 2.- Análisis Molecular en línea germinal de los genes de la menina, *GNAS*, *CDKN1B*, *PRKAR1A*, y *AIP*.
- 3.- Establecer las bases para poner en marcha un registro de tumores Hipofisarios en la infancia y adolescencia en colaboración por la SEEP y la SEEN y completar el registro del Grupo de NeuroEndocrinología de la SEEN (Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición).

METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.

Estudio multicéntrico nacional retrospectivo y de casos nuevos. Análisis descriptivo clínico-genético-molecular en una serie de pacientes, niños y adolescentes, con sospecha clínica de adenomas hipofisarios familiares o esporádicos.

1. Sujetos de estudio:

Se realizará el estudio clínico y genético a niños y adolescentes (< de 20 años al diagnóstico) diagnosticados de adenomas hipofisarios familiares o esporádicos procedentes de consultas de Endocrinología y Endocrinología Pediátrica de Hospitales del Sistema Nacional de Salud.

Participarán en la recogida de las muestras aquellos hospitales del Estados que sigan a estos pacientes. Se estudiarán al menos 80 pacientes durante los 2 años, procedentes de los centros mencionados anteriormente.

Todas las muestras serán recogidas tras informar a los pacientes y/o sus padres mediante la Hoja de información al paciente (Anexo 1) y una vez hayan firmado la hoja del Consentimiento Informado (Anexo 2).

Se analizarán pacientes controlados en los diferentes centros por tumores hipofisarios previos o nuevos que hayan precisado o no cirugía.

Criterios de inclusión:

- Diagnóstico de adenoma hipofisario familiar o esporádico.
- Edades comprendidas entre los 0 y 20 años.
- Aceptación por parte de los padres de participar en el estudio con consentimiento informado. A los médicos de referencia se les solicitará que rellenen los consentimientos informados y la hoja de recogida de datos. Estos documentos están aprobados por el Comité ético de investigación clínica (CEIC) del Hospital Universitario Cruces.

Criterios de exclusión:

- Ausencia de uno o varios de los criterios mencionados anteriormente.
- Negativa a participar en el proyecto.

Variables a estudiar:

Adenomas hipofisarios (tipos de secreción endocrina), edad, sexo, antecedentes familiares y genes a estudio.

2. *Recogida y análisis de datos:*

1.- Identificación de pacientes y obtención de muestra.

A los pacientes con adenomas hipofisarios y a sus padres se les extraerá una muestra de sangre con EDTA (5ml) para el estudio genético, y una muestra de suero (3ml) para la determinación de diferentes parámetros bioquímicos y hormonales. Las muestras debidamente registradas, serán enviadas y analizadas en el laboratorio de Genética de la diabetes y enfermedades endocrinas del Instituto BioCruces.

2.- A todos los pacientes se les recogerá **datos clínicos y analíticos** mediante la Hoja de Recogida de datos clínicos.

A los pacientes con tumores previos, se les realizará una analítica endocrinológica de control para ver la situación actual, y se valorará la situación endocrina que llevó al diagnóstico en los casos de tumores previos. A los pacientes nuevos se les estudiará el perfil endocrino actual. Además, se analizarán las muestras de los padres de los pacientes con trastorno genético positivo.

3.- Estudio genético:

A. Extracción de ADN:

Se realizará la extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica por métodos estándar con el kit de extracción QIAamp DNA Blood Minikit (Qiagen, Germany) según las instrucciones del fabricante.

B. Diseño del panel de genes: Diseño de un panel de genes para secuenciación masiva para los 5 genes objeto de estudio: MEN1, CDKN1B, PRKAR1, AIP, GNAS, utilizando la herramienta informática: Ion Torrent-Life Technologies.

C. Metodología molecular: Una vez diseñado el panel de genes y obtenido las muestras de DNA de buena calidad, procederemos a la secuenciación masiva de los 5 genes mencionados.

D. Análisis bioinformático de datos: El análisis se realizará mediante la utilización del software Ion Reporter™ de Life Technologies

E. Análisis y priorización de las variantes: Las variantes detectadas se enfrentarán a las bases de datos disponibles para apoyar/refutar la casualidad y distinguir las nuevas mutaciones de los polimorfismos comunes no patogénicos.

F. Validación de las mutaciones: Cada mutación/variante encontrada con un posible efecto deletéreo será validada mediante PCR y posterior secuenciación convencional capilar tipo Sanger.

4.- Registro de Tumores hipofisarios

En función de los datos obtenidos, y del interés científico, se valorará con la SEEP y con la SEEN avanzar en el diseño de un Registro de Adenomas hipofisarios dependiente de las Sociedades Científicas.

AUTORÍA DEL ESTUDIO

En función de los datos obtenidos (número de pacientes, características de los datos, etc, ...) se valorará hacer diferentes publicaciones científicas clínicas y/o genéticas. Las profesionales que aporten casos figurarán entre los autores del trabajo.