

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO



*Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali*

*Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità*

*Corso di Dottorato in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche XXV ciclo*

## **RUOLO DEL POLIMORFISMO CA (19) DELLA REGIONE PROMOTER DEL GENE IGF-1 SULLA PRESENTAZIONE CLINICA DEI PAZIENTI ACROMEGALICI.**

Settore scientifico disciplinare: MED 13

Tesi di Dottorato di:

Elisa Sala

Matricola: R08617

Tutor: Dott.ssa Giovanna Mantovani

Coordinatore del Corso di Dottorato: Prof. Paolo Beck-Peccoz

**ANNO ACCADEMICO 2011-2012**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	Pag. 1
<b>1 LA MALATTIA ACROMEGALICA</b>	Pag. 1
1.1 Introduzione ed eziopatogenesi	Pag. 1
1.2 Epidemiologia e presentazione clinica	Pag. 3
1.3 Diagnosi	Pag. 9
1.4 Terapia dell'acromegalia: obiettivi e criteri di cura	Pag. 12
1.5 Chirurgia	Pag. 15
1.6 Radioterapia	Pag. 17
1.7 Terapia medica	Pag. 20
<b>2 ASSE GH-IGF-I</b>	Pag. 26
2.1 Secrezione e regolazione	Pag. 26
2.2 IGF-I: struttura e recettore	Pag. 30
<b>3 GENETICA</b>	Pag. 33
3.1 Polimorfismi	Pag. 33
3.2 Microsatelliti	Pag. 35
3.3 Polimorfismo IGF-I 19 (CA) repeat	Pag. 37
3.4 Polimorfismo IGF-I 19 (CA) repeat e acromegalia	Pag. 39
<b>MATERIALI E METODI</b>	Pag. 40
<b>1 PAZIENTI INCLUSI NELLO STUDIO E DATABASE</b>	Pag. 40

<b>2 DETERMINAZIONE DEL GENOTIPO</b>	Pag. 42
2.1 Estrazione del DNA da sangue	Pag. 42
2.2 PCR e analisi dei microsatelliti	Pag. 43
<b>3 METODICHE DI DOSAGGIO</b>	Pag. 48
<b>4 ANALISI STATISTICHE</b>	Pag. 50
<b>RISULTATI</b>	Pag. 51
<b>1 ANALISI DEL GENOTIPO</b>	Pag. 51
<b>2 VALUTAZIONE ORMONALE ALLA DIAGNOSI</b>	Pag. 52
<b>3 VALUTAZIONE METABOLICA ALLA DIAGNOSI</b>	Pag. 54
<b>3 OUTCOME</b>	Pag. 56
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	Pag. 59
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	Pag. 62

# INTRODUZIONE

## 1. LA MALATTIA ACROMEGALICA

### 1.1 Introduzione ed eziopatogenesi

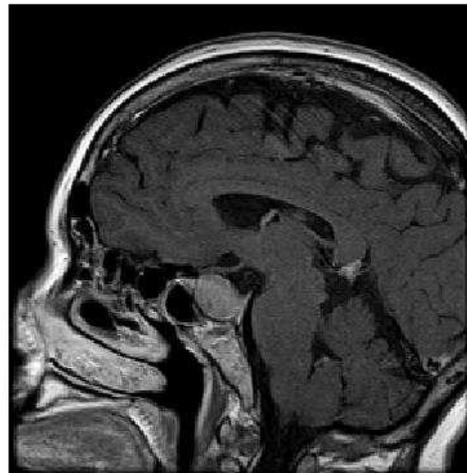
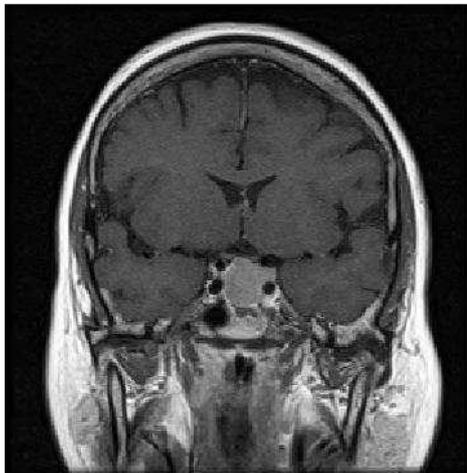
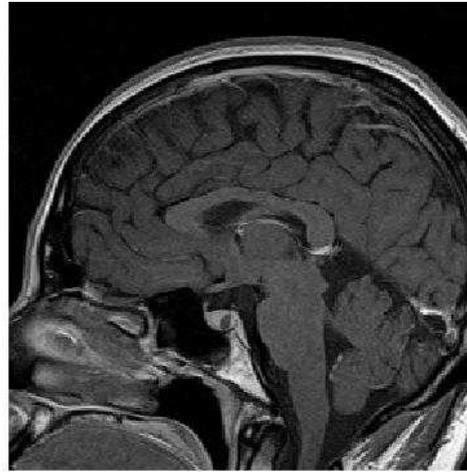
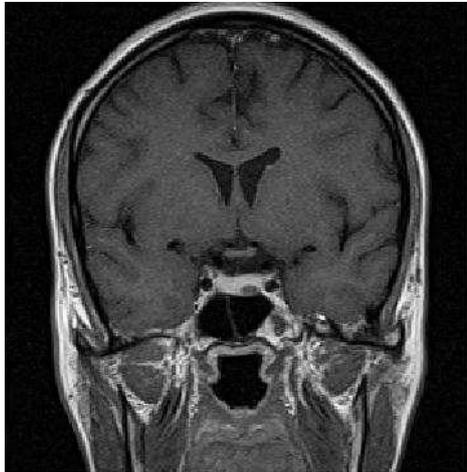
Il termine “acromegalia” deriva dal greco *ακρον* che significa estremità e *μεγα* cioè ingrandimento, dall'osservazione delle stimate caratteristiche e più visibili della malattia: l'ingrossamento del volto, delle mani e dei piedi. L'acromegalia è causata da ipersecrezione cronica di GH dovuta, nella quasi totalità dei casi, alla presenza di un adenoma ipofisario GH-secernente. Circa nel 75% dei casi si tratta di macroadenomi, dunque con dimensioni superiori ai 10 mm. Inoltre in circa il 25% dei casi si verifica una secrezione mista di GH e PRL, e in circa il 2% dei casi la secrezione mista riguarda GH e TSH (Melmed, 2008). In meno dell'1% dei casi l'ipersecrezione di GH è dovuta invece ad un'iperproduzione di GHRH, che può derivare da una neoplasia ectopica o più raramente ipotalamica. In questi casi i tumori più spesso coinvolti sono i carcinoidi bronchiali, intestinali o derivanti dalle isole pancreatiche. (Faglia, 1992)

Nel 40% circa dei GH-omi sporadici è stata dimostrata la presenza di mutazioni puntiformi che causano una attivazione costitutiva della proteina  $G\alpha$  (gsp) con conseguente aumento del cAMP. Il cAMP funge da secondo messaggero e determina l'attivazione della secrezione di GH indipendentemente del legame con GHRH e la proliferazione della cellula mutata, che acquisisce pertanto un vantaggio accrescitivo. Tuttavia non sembrano esistere caratteri clinici distintivi che differenzino i pazienti con e senza la mutazione gsp. (Spada, 1992)

L'acromegalia po' anche essere associata a sindromi familiari quali le neoplasie endocrine multiple di tipo 1 (MEN 1), la sindrome di McCune Albright, e il complesso di Carney (Melmed, 2006).

1

2



3

4

**Fig. 1. Immagine RMN di macroadenoma (1-2) e microadenoma (3-4) ipofisario.**

## 1.2 Epidemiologia e presentazione clinica

L'incidenza dell'acromegalia è pari a circa 3-4 casi per milione di abitanti per anno e con una prevalenza di circa 40-70 casi per milione. Colpisce entrambi i sessi con una lieve prevalenza del sesso femminile (F:M=1.4:1) e l'età media alla diagnosi è 40-44 anni circa (Ezzat, 1994; Holdaway, 2004). Data la lenta e subdola progressione della malattia, la diagnosi viene ancora oggi posta con molti anni di ritardo (da 4 ad oltre 10) rispetto al momento della reale insorgenza. Questo aspetto è clinicamente rilevante perché i pazienti acromegalici, se non adeguatamente e tempestivamente trattati, presentano una mortalità aumentata di circa 1,5 volte rispetto alla popolazione generale con una riduzione della aspettativa di vita pari a circa 10 anni. (Ben Shlomo, Melmed, 2008)

La presentazione clinica dell'acromegalia è legata sia ai segni e sintomi dovuti alla presenza dell'adenoma ipofisario ed al suo effetto massa, sia a quelli dovuti agli effetti sistemici dell'ipersecrezione cronica di GH e quindi dell'attività periferica del mediatore di origine epatica Insulinlikegrowthfactor 1 (IGF-I).

I sintomi causati dall'effetto compressivo dell'adenoma sulle strutture circostanti sono essenzialmente tre: cefalea, sintomi visivi e ipopituitarismo.

Il sintomo più caratteristico è sicuramente la cefalea, presente in circa il 60% dei pazienti, determinata dalla compressione delle terminazioni dolorifiche, da un aumento della pressione intracranica oppure da uno stiramento del diaframma sellare innervato dalla prima branca del nervo trigemino. La cefalea tipicamente riferita come gravativa e retrorbitaria, frontotemporale o al vertice, può essere particolarmente grave ed invalidante, e non responsiva alla terapia con i comuni analgesici.

I più comuni sintomi visivi sono rappresentati da deficit campimetrici e dalla riduzione dell'acuità visiva, presenti in circa il 10% dei pazienti. Il caratteristico difetto del campo visivo consiste nell'emianopsia bitemporale, causata dalla compressione delle fibre dei nervi ottici che si incrociano a livello del chiasma. In alcuni casi si può avere la comparsa di uno scotoma giunzionale, che consiste in uno scotoma centrale unilaterale associato ad una quadrantopsia temporale superiore controlaterale.

Infine anche un quadro di ipopituitarismo, parziale o unitropico, può essere un sintomo di malattia caratteristico soprattutto in presenza di adenomi di importanti dimensioni. In questi casi i segni ed i sintomi saranno riferibili al deficit della singola tropina presa in esame.

I segni riferibili all'ipersecrezione di GH/IGF-I comprendono l'accrescimento acrale, alterazioni fisionomiche quali prognatismo, diastasi dentaria, allargamento della piramide nasale e accentuazione delle bozze frontali. Infatti i tipici sintomi riferiti dai pazienti acromegalici sono il restringimento di scarpe ed anelli, la modificazione dei lineamenti e della totale fisionomia del volto e problemi masticatori.

L'ipertrofia ed iperplasia dei tessuti molli e l'aumento di circa il 10% del tessuto connettivo sono alla base dell'aumento delle dimensioni di diversi organi: caratteristiche sono infatti nel paziente acromegalico macroglossia, cardiomegalia, epatosplenomegalia, dolico colon e gozzo. Non soltanto la struttura di questi organi, ma anche la loro funzione viene modificata dall'azione di IGF-I. Al momento della diagnosi aritmie, ipertensione e vizi valvolari sono presenti nel 60% dei pazienti che, se non trattati, procedono verso un quadro di insufficienza cardiaca. Alterazioni della funzione respiratoria, in particolare sleep apnea sono documentabili nel 50% dei pazienti, legati alla pneumomegalia oltre che all'edema dei tessuti molli, alla

macroglossia e ai polipi nasali. Frequenti sono infatti anche alterazioni delle vie aeree superiori ed inferiori come polipi nasali, riniti ed alterazioni del tono di voce.

Di particolare rilevanza sono inoltre le alterazioni del metabolismo glicidico, lipidico e proteico. Infatti le azioni dirette del GH comprendono anche alcuni effetti metabolici come la riduzione dell'azione insulinica e la stimolazione della lipolisi con diretta ed indiretta induzione di insulino-resistenza. In particolare le alterazioni del metabolismo glucidico si riflettono quindi in una ridotta tolleranza ai carboidrati (40-50%) o in un diabete mellito conclamato (15-20%) in un quadro di insulino-resistenza ed iperinsulinemia. E' stata inoltre dimostrata l'associazione della insulino-resistenza ad un ridotto uptake di glucosio a livello epatico e muscolare e ad un alterato metabolismo del glucosio a livello epatico. Quando l'iperinsulinemia non è più sufficiente a controbilanciare l'insulino-resistenza, si sviluppano diabete mellito quale complicanza della malattia acromegalica. (Colao, 2004)

Anche per quanto riguarda il metabolismo lipidico, sono state dimostrate numerose alterazioni causate dall'ipersecrezione cronica di GH, senza dubbio di particolare importanza per quanto riguarda il controllo del rischio cardiovascolare nei pazienti acromegalici. Queste modificazioni consistono in un aumento degli acidi grassi liberi circolanti (NEFA), nella riduzione dei livelli di high density lipoprotein (colesterolo HDL), nell'aumento della percentuale di low density lipoprotein (LDL) piccole e dense rispetto alle forme meno aterogene e nell'aumento della lipoproteina(a) (Arosio 2000).

Anche il metabolismo proteico è alterato con conseguenti modificazioni della composizione corporea che porta ad aumento della massa magra con conseguente riduzione della massa grassa.

SEGNO	%	SINTOMO	%
Ingrossamento estremità	98	Restringimento scarpe	88
Visceromegalia	90	Restringimento anelli	87
Artrosi	76	Artralgie	80
Gozzo	80	Iperidrosi, seborrea	68
Cute oleosa	70	Modificazione dei lineamenti	67
Diastasi dentaria	65	Cefalea	60
Ridotta tolleranza ai carboidrati	50	Problemi masticatori	55
Irsutismo	43	Sleep apnea	52
Ipertensione arteriosa	30	Irregolarità mestruali	50
Diabete mellito	20	Astenia e diminuzione delle forze	35
Deficit campimetrici	10	Ridotta potenza	30
Galattorrea	4	Sindrome del tunnel carpale	28
		Alterazioni dell'umore	10

**Tab.1. (modificata da Faglia, Beck-Peccoz , 2006) Frequenza dei principali segni e sintomi nell'acromegalia.**

I pazienti acromegalici hanno inoltre un'aumentata incidenza di patologie tumorali benigne come polipi adenomatosi del colon (45% dei pazienti, spesso di tipo precanceroso), skin-tags cutanei e, nelle donne, tumori benigni dell'utero. Molto più controverso è il rapporto tra acromegalia e tumori maligni. Sulla base dei dati attualmente disponibili, non sembra tuttavia che l'incidenza di tumori maligni sia più alta nella popolazione acromegalica che in quella generale, tranne per i carcinomi del colon il cui rischio sembra essere aumentato di 2 volte rispetto alla popolazione generale.

Per quanto riguarda i meccanismi eziopatogenetici, l'oncogenesi potrebbe essere favorita da effetti mitogeni ed anti-apoptotici indotti da GH ed IGF-I, dall'iperinsulinemia, e a livello intestinale, anche da fattori locali come l'alterata secrezione di acidi biliari, l'alterata immunità cellulare, la suscettibilità genetica condivisa, le aumentate dimensioni e la riduzione della peristalsi. Per quanto riguarda la mortalità, nella più grossa casistica pubblicata è stato osservato un significativo aumento di mortalità per carcinoma mammario nelle donne e di carcinoma del colon in entrambi i sessi rispetto alla popolazione generale. E' quindi possibile che l'acromegalia non controllata possa dare un vantaggio accrescitivo alle neoplasie, più che indurre tumori maligni "de novo". La mortalità per patologia tumorale come quella per le altre cause si stratifica in accordo con i livelli di GH, pertanto se la malattia è controllata in modo ottimale essa diventa sovrapponibile a quella della popolazione generale. (Orme, 1998; Holdaway, 2004).

Altri segni frequenti nell'acromegalia sono: cute ispessita e seborroica, iperidrosi e formazione di cisti sebacee.

Inoltre i pazienti acromegalici hanno un aumentato rischio di sviluppare patologie

neuro-psicologiche come labilità emotiva, distorsione dell'immagine corporea, dipendenza da farmaci per i disturbi cefalgici e reumatici con conseguente riduzione della qualità di vita. La presenza simultanea di più segni e sintomi caratteristici dovrebbe indurre a porre il sospetto clinico di acromegalia e quindi a procedere con gli accertamenti richiesti per la conferma della diagnosi. (Molitch, 1992; Nabarro, 1997; Melmed, 2008).

### 1.3 Diagnosi

La diagnosi di acromegalia è basata su evidenze cliniche e biochimiche. Posto il sospetto in base alla sintomatologia e alle modificazioni somatiche, il primo passo per raggiungere la diagnosi è la misurazione dei livelli di IGF-I. (Cordero, 2008; Ben Shlomo, 2008).

Il dosaggio di IGF-I è di particolare utilità perché estremamente sensibile e specifico: infatti l'acromegalia è l'unica malattia nota in cui si riscontrano livelli elevati di IGF-I ed, in assenza di altre patologie, tutti i pazienti acromegalici mostrano concentrazioni elevate di IGF-I. Tuttavia i livelli di IGF-I sono influenzati anche da altri fattori quali la nutrizione, la funzione epatica, la presenza di patologie infettive/infiammatorie anche intercorrenti e soprattutto l'età cronologica. Infatti i livelli di IGF-I sono bassissimi nel primo anno di vita, quindi aumentano progressivamente fino alla pubertà, quando raggiungono il loro picco, per poi progressivamente ridursi soprattutto dopo i 40 anni e raggiungere valori più bassi dopo i 60-70 anni. Per questo motivo, sono stati definiti dei precisi range di normalità che, anche nell'età adulta, devono essere specificati per ogni decennio. Se correttamente dosato ed in assenza di altre patologie l' IGF-I correla meglio del GH con l'attività della malattia ed i sintomi clinici. Tuttavia la correlazione tra le concentrazioni medie di GH nelle 24 ore ed i livelli di IGF-I è di tipo logaritmico e quindi i livelli di IGF-I si modificano molto poco con il crescere dei livelli di GH >20 µg/L. I livelli di GH, anche se sicuramente più semplici da dosare, sono influenzati da fattori come sonno, stress, pasti ed attività fisica ed inoltre mostrano fluttuazioni giornaliere, sia nel soggetto normale che in quello acromegalico, poiché il GH ha una secrezione pulsatile. Dunque per una corretta valutazione dei livelli di GH è pertanto

necessario eseguire prelievi seriati (da 5 a 7 ogni 30 minuti nel corso di 2-3 ore), con il soggetto sveglio, a digiuno, seduto e durante infusione di soluzione fisiologica, in modo da evitare lo stress di ripetute venipunture. In questo modo, nel soggetto sano i livelli di GH scendono a valori in genere inferiori ai limiti di sensibilità dei metodi e comunque sempre  $<2.5\mu\text{g/L}$ .

L'esame cardine per la diagnosi della malattia acromegalia resta comunque il test dinamico di inibizione con carico orale di 75 gr di glucosio (OGTT). Il valore al di sotto del quale la malattia può essere esclusa si è progressivamente ridotto nel tempo a partire da 5-6  $\mu\text{g/L}$  negli anni '70 fino a  $1\mu\text{g/L}$  e per alcuni autori 0.4 secondo le attuali linee guida. (Giustina, 2010). Nella maggior parte dei pazienti acromegalici invece le concentrazioni di GH non sono influenzate dall'assunzione del glucosio, o addirittura aumentano definendo la risposta paradossa (20% circa dei casi) oppure mantengono una tendenza alla flessione senza tuttavia mai ridursi sufficientemente. L'OGTT non è specifico solo per l'acromegalia dal momento che una risposta di GH alterata può essere presente anche in altre situazioni come la pubertà, la gravidanza, il diabete mellito, l'insufficienza epatica o renale, l'anoressia nervosa. Effettuare un test di carico orale con glucosio in questi soggetti ha quindi una duplice utilità, potendo nello stesso tempo fare diagnosi di acromegalia e valutare la possibilità della frequente alterazione della tolleranza ai carboidrati. E' ovvio che questo test non può essere utilizzato in presenza di diabete mellito conclamato (Cordero, 2008; Ben Shlomo, 2008).

Una volta confermata la diagnosi biochimica di acromegalia, è necessario eseguire una valutazione strumentale che comprende la diagnostica d'immagini. La risonanza magnetica nucleare con mezzo di contrasto è preferita alla TAC per evidenziare la presenza e le dimensioni di un adenoma ipofisario ed i suoi rapporti con le strutture

circostanti (posizione intra od extrasellare, invasione del seno cavernoso, vicinanza/compressione del chiasma ottico, etc.). In caso di tumori che si avvicinano o comprimono il chiasma o le vie ottiche è sempre indispensabile un esame del visus ed una valutazione del campo visivo.

A completamento diagnostico è necessario inoltre valutare l'eventuale presenza di alterazioni nella secrezione di altre tropine ipofisarie attraverso lo studio dei livelli di PRL, delle funzioni surrenalica, tiroidea e gonadica. Anche l'eventuale associazione dell'acromegalia con altre patologie endocrine e non endocrine come ad esempio nelle già citate MEN1 oppure sindrome di McCune-Albright va indagata.

Infine, è necessario valutare con accertamenti specifici l'eventuale presenza delle diverse complicanze correlate all'acromegalia precedentemente descritte, quali ipertensione arteriosa, miocardiopatia, diabete mellito o IGT, dislipidemia, polipi a livello del colon, patologia ossea, disordini a carico dell'apparato riproduttivo, complicanze neuro-fisiologiche, patologia polmonare o sleep apnea. Tali accertamenti dovranno poi essere ripetuti periodicamente durante il follow-up dei pazienti acromegalici ( Ben Shlomo, 2008).

## **1.4 La terapia dell'acromegalia: obiettivi e criteri di cura**

La terapia dell'acromegalia ha come obiettivo principale quello di normalizzare la mortalità complessiva, riportandola a valori sovrapponibili a quelli della popolazione generale per età e sesso e il miglioramento generale della qualità della vita del paziente. Obiettivi primari per tale scopo sono dunque quelli di normalizzare i livelli di GH e di IGF-I, eliminare i sintomi e i segni della malattia, controllare le patologie associate ed infine eliminare, o quantomeno ridurre o controllare, le dimensioni della massa adenomatosa . (Melmed, 2009).

Per testare l'efficacia della terapia e poter decretare la guarigione, nel caso si tratti di una terapia chirurgica o radiante, o il controllo della patologia, per quanto riguarda la terapia farmacologica, è necessario individuare dei criteri biochimici che permettano di classificare i pazienti basandosi sui dosaggi di IGF-I, media della secrezione di GH e GH nadir durante test di stimolo od infusione di soluzione fisiologica. Nel corso degli anni sono stati apportati numerosi cambiamenti ai cut off diagnostici; a partire dai livelli medi di GH durante infusione di soluzione fisiologica al di sotto di 5 µg/litro durante gli anni '80. Grazie a studi epidemiologici successivi, ma soprattutto al miglioramento delle metodiche di dosaggio, il safe level per individuare l'efficacia della terapia è stato identificato a valori medi di GH al di sotto di 2.5 µg/litro durante infusione di soluzione fisiologica (Giustina, 2000). Studi ancora più recenti hanno proposto un livello di GH inferiore a 1 µg/litro, dosato con le attuali metodiche ultrasensibili, quale safe level capace di riportare la mortalità dei pazienti acromegalici pari a quella della popolazione generale (Holdaway, 2004). Tuttavia anche nelle più recenti linee guida pubblicate il cut off per identificare il pieno raggiungimento dell'obiettivo della terapia è rimasto stabile

a livelli di GH < 2,5 di µg/litro durante infusione di soluzione fisiologica.

Anche per quanto riguarda il follow up della malattia particolare importanza è rivestita dal test con carico orale di 75 gr di glucosio (OGTT). Come per l'esame a finalità diagnostica, anche nel follow up post chirurgico o per la valutazione dell'efficacia della terapia medica, questo test si è rivelato efficace nel sottolineare la remissione o il controllo di malattia in presenza di un nadir della secrezione di GH <1µg/litro, ed inoltre utile per il monitoraggio delle frequenti complicanze di alterazioni del metabolismo glicidico e diabete mellito. Di conseguenza la presenza contemporanea di normali livelli di IGF-I per età, di livelli medi di GH inferiori a 2,5 µg/L durante fleboclisi di soluzione fisiologica e di un nadir di GH inferiore a 1 µg/L dopo carico orale di glucosio sono attualmente i criteri internazionalmente riconosciuti per la cura biochimica dell'acromegalia. (Giustina, 2010).

Tuttavia in circa il 30% dei pazienti acromegalici in terapia è stata osservata una discordanza tra i livelli di GH e IGF-I. Nella maggior parte dei casi i livelli di GH si normalizzano e i livelli di IGF-I invece rimangono superiori al range di norma; mentre in una piccola percentuale di casi avviene il contrario. Tali pazienti vengono definiti comunemente “discrepanti” e non è ancora presente accordo in letteratura su quale debba essere l'approccio terapeutico. (Carmichael, 2009; Trainer, 2000; Lau, 2008). Le alterazioni di questo tipo spesso vengono attribuite ad errori di dosaggio o ad altre situazioni patologiche che possono alterare i livelli di questo ormoni (come l'insufficienza epatica o renale, BPCO, le malattie infiammatorie intestinali, DM scompensato), o ancora discrepanze iatrogene come la radioterapia. Un recente studio infatti ha suggerito che nei pazienti sottoposti a radioterapia possa essere presente una discrepanza tra i livelli di IGF-I e GH; poiché la radioterapia stessa provocherebbe un

modello “piatto” di secrezione di GH (Van der Klaauw, 2009). Una volta escluse tutti questi possibili fattori confondenti non sono ancora state stabilite delle chiare linee guida per il trattamento di questi pazienti. Le consensus più recenti consigliano controlli ravvicinati e un approccio che meglio si adegui al contesto clinico, non dimenticando la possibilità di una valutazione dei più noti polomorfismi del GH che potrebbero rivelarsi di una qualche utilità in questo contesto. (Freda, 2009; Bianchi, 2009; Giustina, 2010).

Il raggiungimento di tutti questi obiettivi richiede al giorno d'oggi un approccio aggressivo, spesso multimodale, che deve essere comunque sempre individualizzato sulle caratteristiche del tumore e sulle esigenze del singolo paziente. Al fine di raggiungere la cura o il controllo di malattia attualmente sono disponibili tre opzioni terapeutiche: la neurochirurgia, la radioterapia e la terapia farmacologica con agonisti dopaminergici, analoghi della somatostatina o antagonisti del GH (Melmed, 2009).

## 1.5 Terapia chirurgica

Il trattamento chirurgico con approccio transfenoidale è il trattamento di prima scelta per i pazienti acromegalici. La chirurgia infatti, eliminando definitivamente l'adenoma, non soltanto riesce a raggiungere l'obiettivo primario del trattamento della patologia, cioè riportare la mortalità ai livelli della popolazione generale normalizzando i livelli di GH e IGF-I, ma è anche l'unico trattamento in grado di curare definitivamente la malattia. Con il trattamento chirurgico vengono inoltre immediatamente eliminati i sintomi causati dalla massa adenomatosa.

Attualmente il trattamento per via transfenoidale è considerato a ragione il trattamento di scelta per la maggior parte dei pazienti, con una percentuale di successo che dipende dalle dimensioni e dall'invasività del tumore, dal grado di ipersecrezione di GH ma anche, e probabilmente soprattutto, dall'esperienza del neurochirurgo. Esistono due differenti tecniche per effettuare un intervento di adenectomia transfenoidale: la microchirurgia che si avvale dell'ausilio della neuronavigazione e l'approccio endoscopico. Attualmente questi interventi vengono eseguiti con la tecnica microchirurgica, grazie soprattutto alle importanti scoperte tecnologiche del settore, che portano continui miglioramenti nell'outcome del trattamento. Per questi motivi l'approccio di scelta è dunque quello microchirurgico rispetto a quello endoscopico che trova meno consensi e indicazioni tra gli esperti.

Nelle casistiche più recenti la percentuale complessiva di remissione risulta intorno al 56%, variando dall'80% per i microadenomi, al 60% per i macroadenomi intrasellari, al 20% per gli adenomi invasivi o tumori di grosse dimensioni con estensione sovrasellare. Tuttavia queste percentuali perdono completamente di significato analizzando le percentuali di remissioni totali di singoli neurochirurghi a confronto. Diversi studi

sottolineano come l'outcome del trattamento chirurgico nel paziente acromegalico sia decisamente influenzato dall'esperienza del singolo neurochirurgo, soprattutto nei casi di macroadenomi o adenomi con invasione extrasellare. Anche nel caso di un reintervento, il chirurgo con esperienza specifica può modificare significativamente l'outcome del trattamento ( Boeving A, 2006; Ludecke Abe, 2006).I progressi terapeutici in campo neurochirurgico comprendono oltre alla nuova via d'accesso la possibilità di eseguire RMN e dosaggi ormonali intraoperatori. Il pretrattamento con analoghi della somatostatina rimane tuttora controverso; tuttavia per la maggior parte degli autori non sembra migliorare i risultati chirurgici (Losa, 2006).

Le complicanze maggiori come rinoliquorrea, diabete insipido permanente, lesioni vascolari, sanguinamenti intraoperatori e lesioni del chiasma ottico si presentano in meno del 3% dei casi, mentre le complicanze minori come ipofunzione ipofisaria, perforazione o deviazione del setto nasale, iponatremia transitoria e sinusiti, in meno del 10%. Per quanto riguarda l'ipopituitarismo, i dati in letteratura indicano che nel 10% dei pazienti trattati con questo approccio chirurgico possa instaurarsi un deficit di secrezione di singole tropine, piuttosto che un panipopituitarismo. Tuttavia va ricordato che i pazienti acromegalici possono presentare anche alla diagnosi alterazioni della secrezione ipofisaria e che nel 5% dei casi questa può regredire dopo l'intervento. La mortalità post e perioperatoria è decisamente molto bassa, tra lo 0 e l'1%, nonostante l'esistenza di molteplici complicanze e comorbidità della malattia acromegalica che possono aumentare significativamente il rischio anestesilogico (Laws, 2006). E' stato inoltre dimostrato che dopo trattamento chirurgico risolutivo tutte le patologie correlate con l'acromegalia migliorano e l'aspettativa di vita viene riportata agli stessi livelli di quella della popolazione generale. La chirurgia rappresenta dunque senza dubbio la terapia di prima scelta per il trattamento dell'acromegalia, tenendo ovviamente in conto

16

rischi, benefici ma soprattutto le caratteristiche del singolo paziente (Ludecke Abe, 2006).

## 1.6 Radioterapia

Esistono due tipi di radioterapia per il trattamento degli adenomi ipofisari: la radioterapia convenzionale frazionata e la radioterapia stereotassica frazionata. La radioterapia convenzionale frazionata è oggi molto meno utilizzata che in passato come terapia adiuvante.

Infatti mentre nella maggior parte dei casi si ottiene un ottimo controllo sulla crescita tumorale, gli effetti sulla secrezione ormonale sono molto meno buoni, e in particolare si raggiunge la normalizzazione dei livelli di IGF-I in una percentuale di pazienti che varia moltissimo tra il 5% ed il 60%. Tuttavia gli svantaggi più importanti sono costituiti dai rischi di gravi effetti collaterali quali un'elevata probabilità di sviluppare ipopituitarismo (circa il 70% dei casi), la possibile induzione di tumore cerebrale secondario (il 2% dopo 20 anni), o di un deficit cognitivo, e un'aumentata quota di incidenti cerebrovascolari (Thorner, 2003).

Visti gli importanti svantaggi ed effetti collaterali della radioterapia convenzionale frazionata, sono venute alla luce altre e più nuove opzioni radioterapiche, come la radiochirurgia mediante  $\gamma$ -knife, o mediante acceleratori lineari specificamente modificati o con acceleratori di particelle. Tali metodiche utilizzano, per arrestare la proliferazione cellulare e l'ipersecrezione ormonale, un'unica precisa dose di radiazioni ionizzanti risparmiando pertanto le strutture circostanti. Queste tecniche tuttavia non possono essere utilizzate se l'adenoma è di grosse dimensioni o se arriva in vicinanza di strutture sensibili come il chiasma ottico. Risultati su questo di terapia hanno dimostrato una elevata efficacia nel controllare la crescita tumorale con modesti effetti collaterali (soprattutto ipopituitarismo e tumori cerebrali secondari), ma il raggiungimento di una

completa normalizzazione ormonale solo nel 25% dei pazienti. Un recente studio ha però dimostrato che la percentuale di pazienti che possono essere definiti curati dall'acromegalia dopo la terapia con  $\gamma$ -knife aumenta dopo 10 anni di follow up. Infatti un follow up più lungo permette di evidenziare la remissione della malattia nel 46% dei pazienti e la normalizzazione dei livelli di IGF-I nell'82%. Tuttavia il follow up a lungo termine mostra anche gli effetti collaterali della terapia con  $\gamma$ -knife, cioè l'aumento della frequenza di ipopituitarismo. Infatti nel 40% dei pazienti inseriti nello studio nel lungo follow up si riscontra iposurrenalismo, nel 13% ipogonadismo e nell'11% ipotiroidismo (Ronchi, 2009).

Attualmente solo pochi centri hanno accesso a queste procedure terapeutiche e ulteriori studi con periodi più lunghi di follow up saranno necessari per poter precisamente definire il ruolo della radiocirurgia nella cura dell'acromegalia (Attanasio, 2003).

## 1.7 Terapia medica

Con il miglioramento delle conoscenze sulla patofisiologia della malattia acromegalica sono state proposte e sviluppate diverse opzioni di trattamento farmacologico che, a differenza del trattamento neurochirurgico e/o radioterapico, non si propone una eradicazione della malattia ma bensì un semplice controllo della secrezione di GH o IGF-I al fine di limitare la sintomatologia e le complicanze a lungo termine.

Ovviamente la terapia medica presenta alcuni svantaggi: per prima cosa la necessità di motivare il paziente all'assunzione di una terapia potenzialmente life-long, oltre che il costo economico da sostenere. Inoltre, come in tutte le terapie farmacologiche, esistono degli effetti collaterali e il rapporto rischio-beneficio di una somministrazione life-long deve essere ben valutata, considerando anche che gli studi epidemiologici hanno già dimostrato l'efficacia della neurochirurgia e della radioterapia nel normalizzare l'aspettativa di vita dei pazienti acromegalici, mentre mancano ancora precise conferme a lungo termine per quanto riguarda il controllo di malattia con la terapia farmacologica (Charmicael, 2008).

La bromocriptina è stato il primo farmaco utilizzato per il trattamento dell'acromegalia, ottenendo una normalizzazione della secrezione di GH in circa il 10% dei casi.

La somministrazione di cabergolina ha invece portato risultati decisamente più significativi, ottenendo una riduzione della secrezione del GH a livelli di normalità in circa il 35% dei casi e una normalizzazione dei livelli di IGF-I nel 32%. La cabergolina è un dopamino-agonista con diverse caratteristiche rispetto alla bromocriptina: presenta infatti una più alta specificità di legame per il recettore D2, una vita media più lunga (circa 65 ore) e minori effetti collaterali (cardiotossicità). La percentuale di

normalizzazione è leggermente più alta nei pazienti con un adenoma misto anche PRL secernente (normalizzazione GH nel 58% e IGF-I nel 35%) e in circa il 60% dei casi è associato ad una riduzione della massa del tumore, mentre non sono disponibili dati sugli effetti della terapia con cabergolina sulle comorbidità (Charmichael, 2008).

A partire dagli anni '80 numerosi studi dimostrano l'efficacia del trattamento con analoghi della somatostatina per l'inibizione della secrezione di GH, partendo dall'osservazione della importante azione inibitoria sulla secrezione anteroipofisaria effettuata dalla somatostatina endogena. Esistono cinque recettori per la somatostatina, SSTR 1-5, accoppiati a proteine G che, modulando la produzione di adenilatociclastasi, inibiscono la secrezione di GH dalle cellule somatotrope. Tuttavia l'applicazione clinica della somatostatina nativa è limitata dalla necessità di somministrazione endovenosa e dalla brevissima emivita, circa tre minuti, legata alla rapida degradazione ad opera di enzimi epatici e renali. Dunque la ricerca farmacologica si è indirizzata allo sviluppo di analoghi della somatostatina con una più lunga emivita, in formulazioni che permettano una più agevole somministrazione e con una maggiore specificità d'azione. Attualmente sono disponibili in Italia per l'utilizzo clinico due formulazioni di analoghi della somatostatina: octreotide e lanreotide. L'efficacia del particolare analogo della somatostatina dipende dalla tipologia e dalla quantità di recettori espressi sulle cellule tumorali e dall'affinità di ciascun analogo per lo specifico recettore. Octreotide e lanreotide in particolare presentano una forte affinità per il sottotipo 2 del recettore, e una minore affinità per il sottotipo 5. Si tratta dei due recettori maggiormente espressi dai GH-omi, in particolare SSTR2 nel 95% dei casi e SSTR5 nell'86%. Le variazioni dell'espressione di questi recettori nei tessuti patologici può spiegare la variabilità della risposta clinica a questo trattamento. Entrambi i farmaci sono disponibili in formulazioni depot, prodotte cioè incorporando in microparticelle di polimeri

biodegradabili la molecola farmacologicamente attiva, rendendolo quindi una composizione a lunga durata d'azione. La posologia riflette infatti queste caratteristiche: octreotide LAR viene somministrato per iniezione intramuscolare con un dosaggio variabile tra 10 e 30 mg ogni 28 giorni, mentre lanreotide SR viene somministrato al dosaggio di 30 mg ogni 7 o 14 giorni, o al dosaggio di 60-120 mg ogni 28 o 56 giorni circa. La possibilità di una normalizzazione ormonale con questa terapia è stata messa in relazione con i livelli di GH pre-trattamento: da studi recenti è stato dimostrato che pazienti con un livello di GH maggiore di 20 µg/L hanno poche probabilità di normalizzare i livelli di GH e IGF-I con la sola terapia medica (Freda, 2002).

L'uso della terapia con analoghi della somatostatina come terapia di prima scelta è stato un argomento molto discusso, ma la conclusione a cui si è giunti nelle ultime linee guida è quella di indicare la terapia di prima scelta con gli analoghi nei pazienti con scarse probabilità di successo chirurgico o con controindicazioni all'intervento o che si oppongono o rifiutano questo tipo di approccio terapeutico.

In passato alcuni studi erano giunti alla conclusione di raccomandare un trattamento con analoghi della somatostatina in previsione dell'intervento chirurgico al fine di ridurre le dimensioni dell'adenoma e di diminuire le possibili complicanze anestesilogiche e migliorare così l'outcome della chirurgia (Cannavo, 2001). Infatti, in studi recenti è stato dimostrato una riduzione del volume dell'adenoma in circa il 25% dei pazienti trattati con analoghi della somatostatina (Colao, 2009). Gli studi più recenti però hanno al contrario dimostrato come il pretrattamento con analoghi della somatostatina non sia associato ad un miglioramento dell'outcome, e che quindi non debba essere raccomandato (Losa, 2006). Diverso è invece il risultato della terapia con analoghi della somatostatina in quei pazienti in cui un primo trattamento chirurgico non è riuscito ad

eliminare completamente l'adenoma e quindi a riportare i valori di GH e IGF-I nel range di normalità. In tutti questi casi la terapia con analoghi si rivela invece fondamentale per mantenere sotto controllo la patologia, anche nei casi già citati di adenomi molto invasivi non responsivi al trattamento farmacologico, che modificano questa situazione dopo una parziale escissione chirurgica (Jallad, 2007).

Vi sono anche altri effetti clinici degli analoghi della somatostatina che sono stati ampiamente studiati. E' ormai noto che possono ridurre l'ipertrofia cardiaca e migliorare la frazione di eiezione, la funzione diastolica e ridurre la possibilità di extrasistoli ventricolari premature con un effetto benefico complessivo della funzione cardiovascolare (Colao, 2004).

Per quanto riguarda gli effetti metabolici gli analoghi della somatostatina includono un parziale miglioramento del profilo lipidico mentre hanno effetti decisamente negativi sul metabolismo dei carboidrati. Infatti, provocando un'inibizione della secrezione pancreatica di insulina e di glucagone e una riduzione dell'insulino resistenza, dovuta in gran parte alla concomitante riduzione dei livelli di GH, e un lieve incremento della glicemia a digiuno, gli analoghi della somatostatina complessivamente hanno dei risultati peggiorativi sul metabolismo dei carboidrati (Ronchi, 2003).

Gli analoghi della somatostatina sono generalmente ben tollerati, anche se molti pazienti lamentano molteplici ma transitori disturbi nei giorni immediatamente successivi alla somministrazione del farmaco come dolori addominali, meteorismo, nausea, diarrea o stipsi, gastrite o dolore in sede di iniezione.

In conclusione, gli analoghi della somatostatina rappresentano un utile strumento terapeutico per il controllo dell'acromegalia soprattutto dopo l'intervento neurochirurgico. La reale normalizzazione della secrezione di GH e IGF-I in pazienti

acromegalici durante terapia con analoghi della somatostatina non supera il 60% dei casi. Esiste infatti una parte di pazienti, variabile tra il 30% e il 40%, in cui la malattia non viene completamente controllata, ed un ulteriore 10% resistente agli analoghi attualmente disponibili (Chanson, 2000).

Un concetto innovativo nel trattamento medico dell'acromegalia sviluppato negli ultimi anni è un antagonista del recettore del GH: il pegvisomant. Si tratta di una molecola di GH modificata con una sostituzione di un singolo aminoacido in posizione 120. Ulteriori modifiche comprendono sostituzioni aminoacidiche, per aumentarne l'affinità di legame e conferirle un vantaggio competitivo di legame rispetto al GH nativo, e la peghilazione per ridurre l'immunogenicità ed aumentarne l'emivita.

Il pegvisomant agisce legandosi ai recettori del GH sulla superficie cellulare e inibendo la dimerizzazione funzionale di tali recettori. Bloccando così il segnale di trasduzione, viene completamente bloccata l'attività del GH, compresa la produzione di IGF-I.

Il caratteristico meccanismo d'azione fa sì che la sua efficacia sia indipendente dalla presenza di recettori a livello del tumore. Agendo quindi alla periferia la terapia con pegvisomant non può dunque essere utilizzata per eliminare tutta la sintomatologia dovuta alla compressione dell'adenoma e al suo "effetto massa", ma soltanto per la sintomatologia dovuta all'azione a distanza dell'ormone stesso.

Il meccanismo d'azione del tutto peculiare deve essere monitorato soltanto con il dosaggio della concentrazione sierica di IGF-I, essendo la misurazione del GH del tutto inutile. Pegvisomant viene somministrato per via sottocutanea una volta al giorno a una dose variabile tra 10 e 40 mg/die (Stewart, 2003; Ho, 2001).

Diversi studi clinici hanno indagato l'efficacia di questo nuovo farmaco; degno di menzione è quello condotto da Trainer che ha valutato 112 pazienti in terapia con

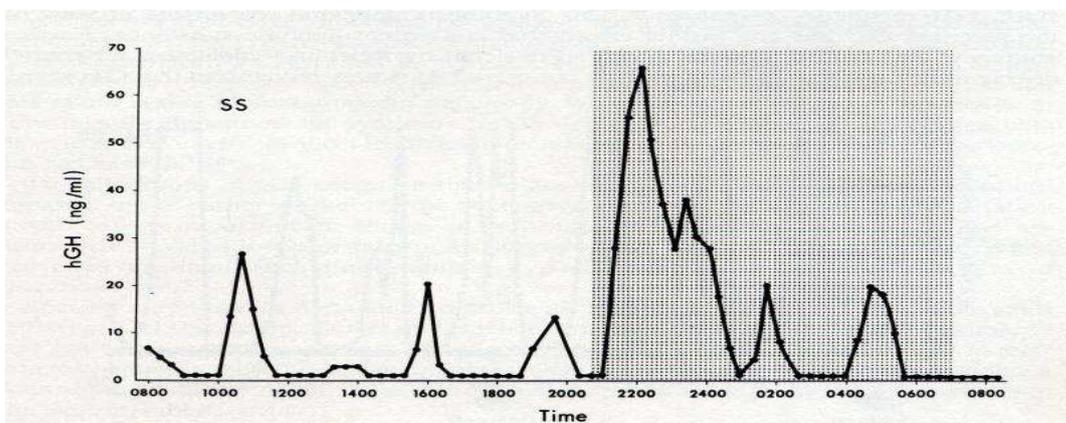
pegvisomant e ottenuta la normalizzazione dei livelli di IGF-I nel 90% dei casi (Trainert, 2000).

Nel loro insieme tutti questi risultati indicano come questo trattamento potrebbe essere il più efficace, tuttavia restano ancora alcune questioni aperte, quali: la possibilità che un trattamento eccessivo possa portare ad una riduzione addirittura al di sotto del range di normalità dei livelli di IGF-I, la possibile formazione di anticorpi e la conseguente tachifilassi, ma soprattutto la sicurezza a lungo termine con particolare riguardo al possibile aumento delle dimensioni del tumore, all'alterazione della funzione epatica e all'ipertrofia locale del tessuto adiposo nel sito di iniezione, oltre all'ovvia tollerabilità del paziente ad una terapia cronica che prevede iniezioni giornaliere.

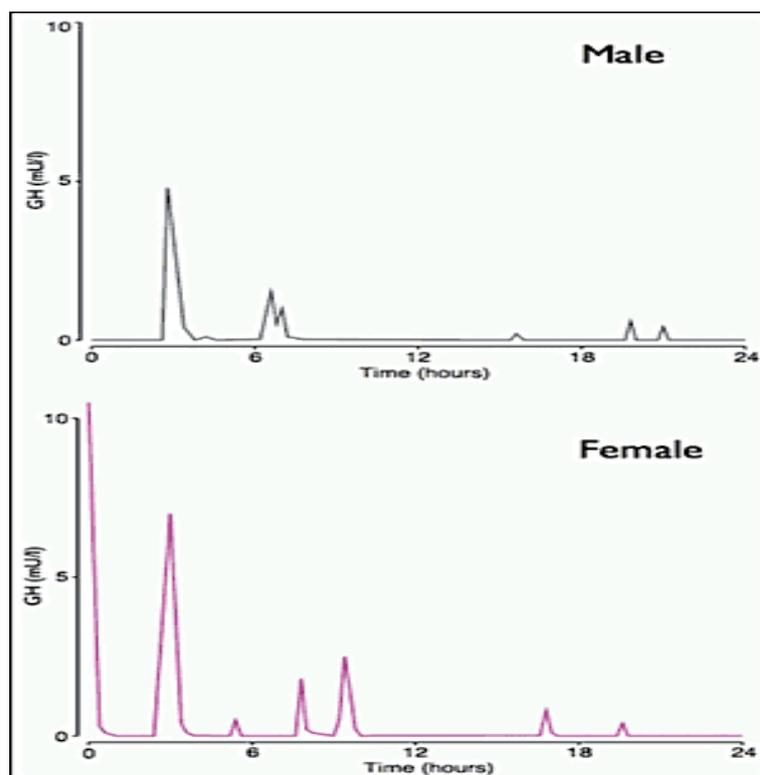
## 2 ASSE GH-IGF-1

### 2.1 Secrezione e regolazione

Il GH è un polipeptide secreto dalle cellule somatotrope dell'ipofisi. Queste cellule costituiscono il 30-50% delle cellule ipofisarie e sono localizzate nella parte anterolaterale dell'ipofisi. Il gene responsabile della sintesi del GH è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 e la sua trascrizione è indotta da specifici fattori di trascrizione quali PIT-1. Per un meccanismo di splicing alternativo vengono originate due varianti: una molecola di 20 kD e una meno abbondante di 22kD (5% circa del GH ipofisario Lewis, 1978; Brabanta, 2003). La secrezione di GH è pulsatile e presenta un ritmo circadiano ed è regolata in senso stimolatorio dal GHRH e dal ghrelin e in senso inibitorio dalla somatostatina con un andamento a fasi contrapposte (figura 2). I picchi secretori costanti insorgono durante la fase del sonno ad onde lente (stadi 3 e 4 del sonno) e si possono riscontrare anche dei picchi variabili e sporadici associati a pasti proteici o all'attività fisica. Tuttavia esistono delle differenze nella secrezione pulsatile tra i due sessi essendo la frequenza della secrezione diurna più frequente nel sesso femminile.



**Fig. 2.** GH: secrezione pulsatile e ritmo circadiano (tratta da Lewis 1978)

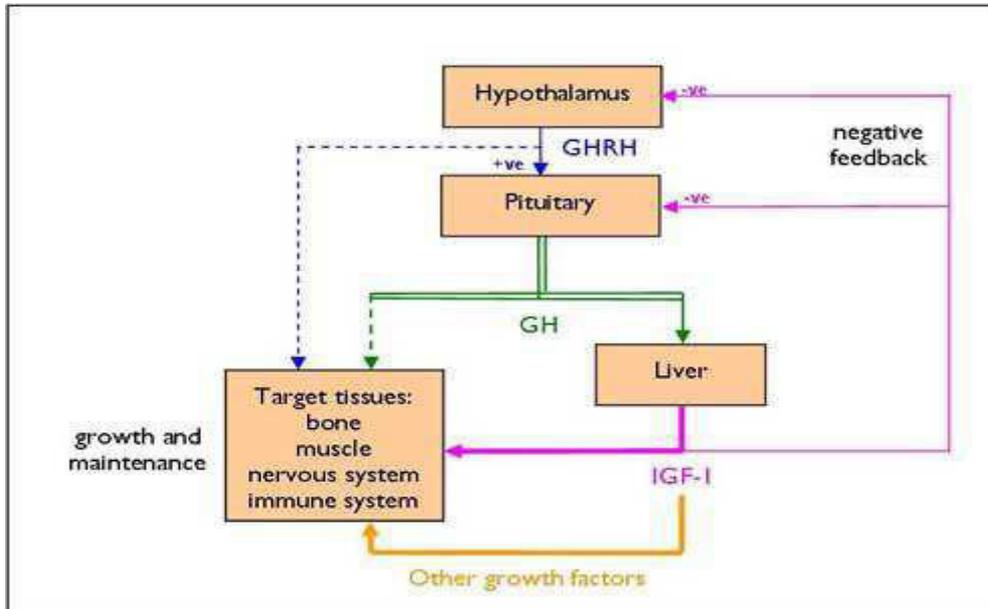


**Fig. 3.** Secrezione giornaliera di GH nei due sessi.

Sia il GHRH che la somatostatina sono regolati a loro volta da fattori nervosi, metabolici e ormonali. Oltre al sonno e l'esercizio fisico esistono altri numerosi fattori che possono stimolare la secrezione di GH come: gli stress psichici, l'iperaminoacidemia, l'ipoglicemia, gli oppioidi, gli estrogeni, gli agonisti  $\alpha$ -adrenergici, gli antagonisti  $\beta$ -adrenergici, la dopamina, la piridostigmina e fattori che invece inibiscono la secrezione come l'iperglicemia, l'aumento degli acidi grassi liberi, gli antagonisti  $\alpha$ -adrenergici, serotoninergici, dopaminergici e colinergici, il GABA e l'eccesso cronico di glucocorticoidi.

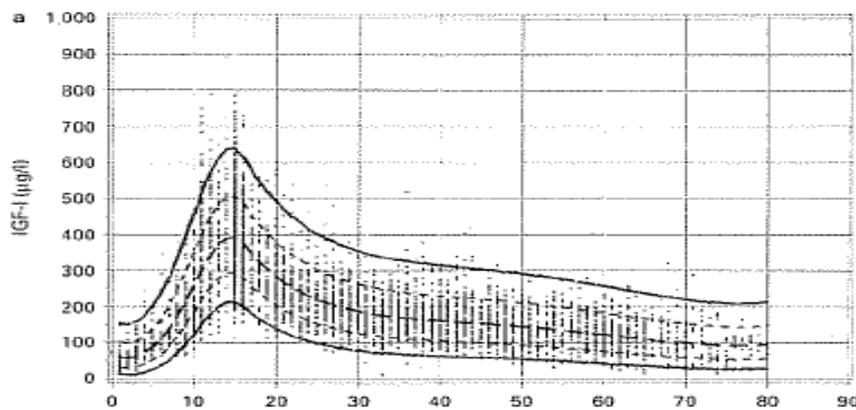
La funzione primaria del GH è quello di promuovere la crescita. Tale funzione è assolta tramite l'induzione della sintesi di IGF-I, prodotto da diversi tessuti, sebbene l'80% della quota circolante sia di origine epatica.

Anche l'IGF-I esercita un feedback negativo diretto e mediato da un aumento della somatostatina (Figura 4). L'IGF-I a sua volta agisce stimolando la sintesi proteica a livello delle cartilagini di crescita e delle massa muscolari.



**Fig. 4.** Asse ipotalamo- ipofisi- IGF-I e fattori di regolazione.

Sia la produzione di GH che dell'IGF-I sono sesso ed età correlate. Le differenze dei livelli di IGF-I in base all'età sono mostrati in figura 5.

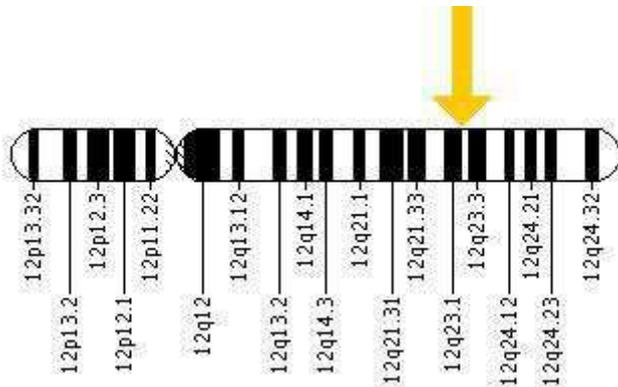


**Fig. 5.** IGF-I: modificazioni con l'età (media,  $\pm 1$  SD,  $\pm 2$ SD). (Figura tratta da Brabanta, 2003)

Prima dei 20 anni i valori di IGF-I risultano essere superiori nel sesso femminile. Inoltre, il picco di secrezione dell'IGF-I nel è anticipato di 1-2 anni rispetto al sesso maschile. Dopo i 20 anni invece, nelle femmine i livelli di IGF-I sono inferiori rispetto ai maschi (Brabanta, 2003). Molti studi suggeriscono un possibile effetto diretto degli ormoni sessuali sul rilascio di IGF-1, in particolare gli estrogeni inibirebbero direttamente la produzione di IGF-1 a livello epatico, mentre il ruolo degli androgeni non sarebbe ancora completamente chiarito. Invece basse dosi di testosterone per breve periodo stimolerebbero la secrezione di GH, in parte attenuando il feedback negativo imposto dal GH stesso (Kerigan, 1992; UdoMeinhardt, 2006).

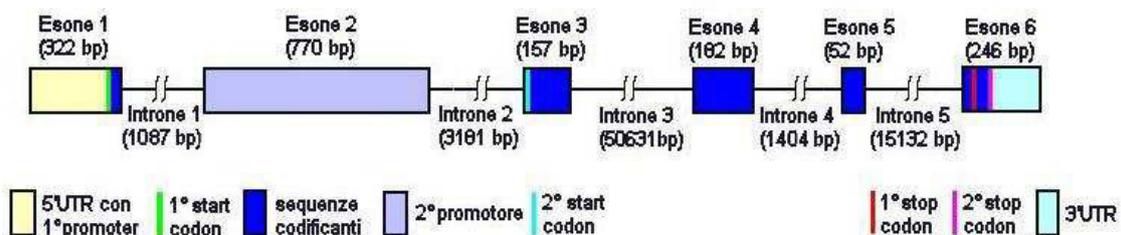
## 2.2 IGF-I: struttura e recettore

Il gene IGF-I è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 12 alla posizione 23.2.; costituito da 6 esoni.



**Fig. 6. Posizione del gene IGF-I sul cromosoma 12**

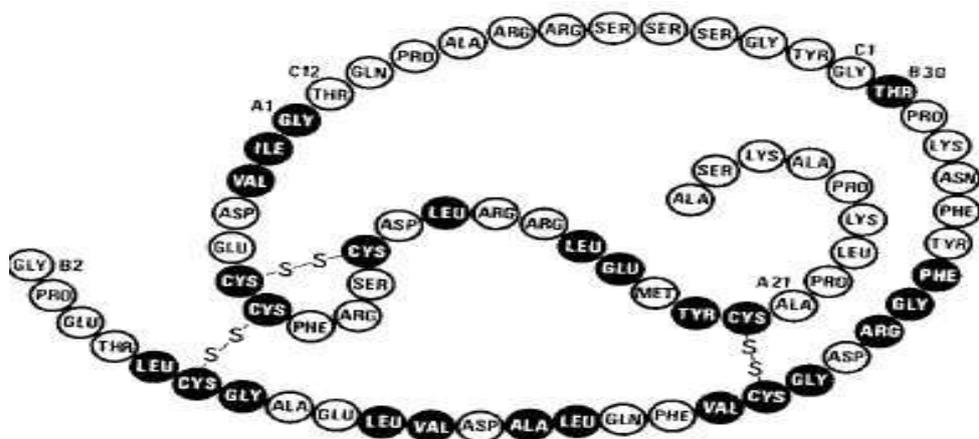
Gli esoni 1, 2, 5 e 6 possono essere riarrangiate mediante splicing alternativo e quindi portare alla sintesi di quattro possibile precursori di mRNA. (1/Ea, 1/Eb, 2/Ea, 2/Eb) espressi in tessuti diversi e nelle diverse fasi dello sviluppo natale e postnatale. Gli esoni 3 e 4 codificano per la porzione N terminale del peptide, l'intera sequenza del polipeptide maturo e i primi 16 residui all'estremità C terminale.



**Fig. 7. Struttura genetica IGF-1**

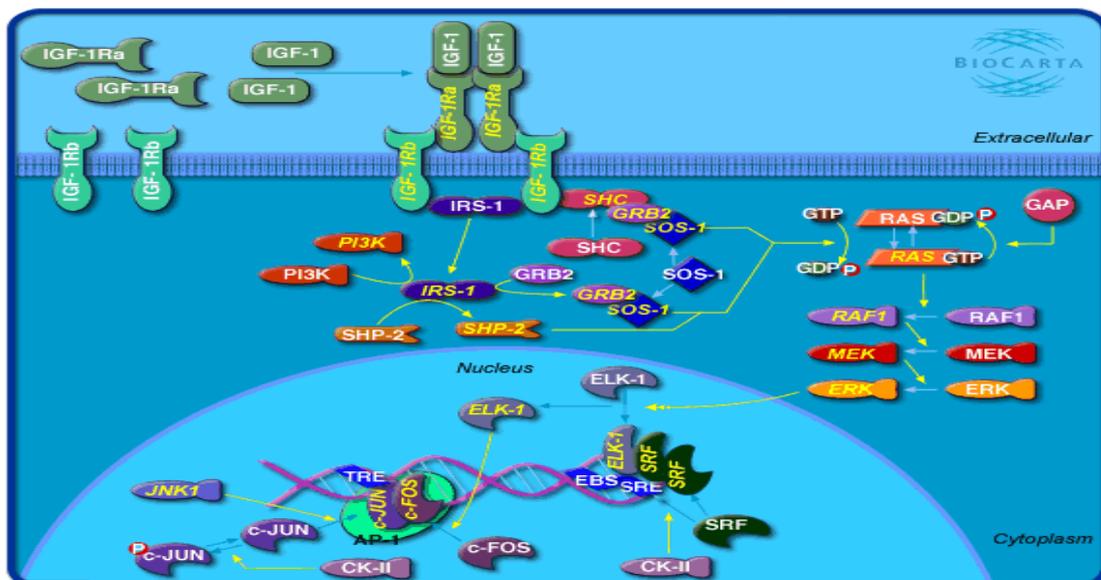
IGF-I è un polipeptide, sintetizzato quasi esclusivamente a livello epatico, non glicosilato, a catena unica di 70 aminoacidi con 3 ponti disolfuro (PM: 7649 dalton). È organizzato in 4 domini (A, B, C, D): A e B sono analoghi ai domini A e B dell'insulina, da cui la sua denominazione, C è analogo al C-peptide, mentre il dominio carbossiterminale D è specifico.

La maggior parte dell'IGF-1 (>95%) circola nel sangue legata a proteine di trasporto (IGF Binding Protein, IGFBP), un gruppo di proteine strutturalmente omologhe che legano in modo specifico l'IGF-1 e l'IGF-2. Sono state identificate 6 diverse specie molecolari di IGFBP; la più importante di esse è l'IGFBP-3 che, insieme a una terza proteina (la "subunità acido-labile"), forma un complesso ternario di 140-150 kDa, corrispondente all'85% circa dell'IGF-I circolante. Solo l'IGF-1 libera è biologicamente attiva; le IGFBP ne regolano, a livello sistemico e recettoriale, la biodisponibilità modificandone l'emivita. Infatti l'IGF-1 libera (1-2% di quella circolante) ha un'emivita di circa 10 minuti; sotto forma di complesso ternario con l'IGFBP-3 l'emivita è di 12-15 ore. (Humbel, 1990; Hwa, 1999)



**Fig. 8.** Sequenza aminoacidica della molecola di IGF-I. In nero sono segnalate le proteine identiche nella molecola di insulina. (Immagine tratta da Humbel 1990)

L'attività di IGF-I è mediata dal legame con il suo recettore, una proteina transmembrana, formata da due subunità  $\alpha$  (135 kDa ciascuna) e due subunità  $\beta$  (90 kDa ciascuna). Le due subunità extracellulari  $\alpha$  contengono il sito di legame per l'ormone; le due subunità  $\beta$  che sono principalmente intracellulari, possiedono l'attività tirosin-chinasica. IGF-I-R, espresso da quasi tutte le cellule dell'organismo, risulta strutturalmente e funzionalmente correlato con il recettore per l'insulina con una omologia strutturale di circa il 60%. L'espressione di questo recettore è regolata dai livelli circolanti di IGF-I, da fattori stimolanti come PDGF, oncogeni, fattori di trascrizione e da fattori inibenti come le stesse IGFBP, l'insulina e geni oncosoppressori. Il legame del recettore con IGF-I determina un cambiamento conformazionale delle due subunità  $\alpha$  e  $\beta$  che porta all'attivazione dei loro siti tirosinchinasici che così si autofosforilano reciprocamente, attivando una cascata di segnali di fosforilazione/attivazione (MAPKK, MAPK, S6K e PP-1) che si traducono nei numerosi effetti dell'IGF-I. (Werner, 2006).



**Fig. 9.** Cascata attività IGF-I (Immagine tratta da Werner, 2006)

### **3. GENETICA**

#### **3.1 Polimorfismi**

E' definito polimorfico un locus per il quale esistono più alleli, ciascuno dei quali è presente in una determinata popolazione con una frequenza maggiore di quella attesa in base a mutazione ricorrente. Se l'allele meno frequente ha nella popolazione generale una frequenza superiore all'1% si parla di locus polimorfico, se invece è inferiore all'1% si parla di variante rara. Sebbene il genoma degli individui sia identico per il 99,9%, la differenza dello 0,1% è in grado di dare luogo a 3 milioni di polimorfismi.

I polimorfismi si dividono ulteriormente in 3 classi:

1. RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP); quando a seguito di una mutazione si determina l'abolizione o la creazione di un sito di restrizione per un enzima di restrizione, con conseguente variazione (polimorfismo) nella lunghezza dei frammenti di restrizione per un dato enzima di restrizione. Sono polimorfismi di un singolo locus e biallelici e sono molto comuni nelle regioni non codificanti del DNA.

2. SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP); variazioni di singole coppie di basi nel genoma. Sono polimorfismi biallelici e, essendo presenti in numero elevato nel genoma umano (almeno 3 milioni) sono utili marcatori genetici.

3. VARIABLE NUMBER TANDEM REPEATS (VNTR); polimorfismi in cui il sito di restrizione viene lasciato intatto, ma la lunghezza del frammento di restrizione varia a seconda del numero di ripetizioni in tandem, testa-coda, tra i due siti di restrizione posti alle due estremità.

Vengono ulteriormente distinti in :

- minisatelliti ( ripetizioni di qualche decina di basi)
- microsattelliti (ripetizioni di 2,3,4 basi come AC, CAG, AAT).

Questi polimorfismi sono multiallelici, essendo molto variabile il numero di ripetizioni e sono facilmente studiabili e analizzabili mediante PCR.

Alcuni di questi polimorfismi non sembrano provocare conseguenze evidenti sul fenotipo, mentre altri alterano l'espressione o la funzione di proteine e determinano la comparsa di fenotipi che possono influenzare la manifestazione di patologie o modificare la risposta ai farmaci; per questo l'interpretazione del loro significato risulta quindi di primaria importanza per l'individualizzazione e la personalizzazione della gestione globale del paziente (Saito, 2008)

## 3.2 Microsatelliti

Con il termine microsatelliti vengono indicate le regioni di DNA caratterizzate da una ripetizione in tandem di una stessa sequenza di 2-6 basi azotate. La ripetizione più frequente nel genoma è la ripetizione Adenosina-Citosina (CA)<sub>n</sub>.

Le ripetizioni dinucleotidiche sono molto comuni e sono altamente polimorfiche. (Russel, 2002).

I marcatori possono essere suddivisi in perfetti, quando sono costituiti da una sequenza ininterrotta di ripetizioni dello stesso motivo di base, imperfetti, quando la sequenza ripetuta risulta interrotta da una o più sequenze non ripetute, e composti, quando sono costituiti da una sequenza di ripetizioni perfetta o imperfetta adiacente ad una seconda sequenza di ripetizioni con diverso motivo di base.

Il numero di ripetizioni del motivo di base del microsatellite è molto variabile, causando polimorfismo, mentre le regioni fiancheggianti dove sono disegnati i primer che permettono il rilevamento di tali ripetizioni, sono conservate.

Sono molto diffusi e interspersi nel genoma, inoltre presentano un elevato livello di variabilità all'interno di ciascuna specie, il che li rende un ottimo strumento per il fingerprinting, la caratterizzazione genetica, le analisi forensi e di parentela nonché per il miglioramento genetico. I vantaggi dei microsatelliti risiedono nella loro elevata riproducibilità e nel loro elevato grado di polimorfismo.

È stato stimato che esiste, in media, una regione SSR ogni 50-750 Kb, in funzione del tipo di motivo ripetuto. Attraverso l'utilizzo di primer specifici è possibile amplificare queste zone del genoma e renderle quindi rilevabili mediante tecniche elettroforetiche.

I primer consentono di amplificare singoli microsatelliti che possono differire tra individui non per il motivo di base, ma per il numero di volte che questo motivo è ripetuto.

### **3.3 Polimorfismo 19 (CA) repeat**

Un microsatellite altamente polimorfico, che comprende un numero variabile di ripetizioni di sequenza Adenosina-Citosina (CA), è stato identificato nella zona del promoter del gene dell'IGF-I 1 kb a monte del sito di trascrizione. Il numero di CA repeat può fisiologicamente variare tra 10 e 24; e studi su ampie casistiche hanno dimostrato che l'allele più comune nella popolazione caucasica contiene 19 CA repeats (192 bp) (Vaessen, 2001).

Negli ultimi anni diversi studi hanno descritto il polimorfismo cercando di identificare una relazione tra questo e i livelli di IGF-I circolanti, tuttavia con risultati contrastanti. Risale al 2001 il primo importante lavoro su una vasta popolazione (900 pazienti affetti da diabete mellito tipo 2) effettuato da Vaessen che ha per primo correlato il ruolo del polimorfismo nella regione promoter dell'IGF-I con la patogenesi del diabete mellito tipo 2 e le patologie cardiovascolari. E' stato infatti dimostrato in modo statisticamente significativo che soggetti non carriers dell'allele 19 CA presentano aumentato rischio relativo di sviluppare diabete mellito tipo 2 o patologie cardiovascolari rispetto ai soggetti carriers e che tale aumento è da porre in relazione ai ridotti livelli di IGF-I circolanti (Vaessen, 2001). Lo stesso risultato è stato successivamente confermato da uno studio del 2004 (Rietveld), in cui sono stati analizzati i dati antropometrici, biochimici e genetici dei pazienti del Rotterdam Study (importante studio epidemiologico olandese comprendente 10662 individui sani). Ulteriore dato analizzato in questo studio è stata l'altezza finale degli individui risultata significativamente maggiore nei pazienti con 19 o più ripetizioni. (Rietveld, 2004).

Tuttavia va segnalata l'assenza di accordo in letteratura rispetto all'argomento di cui sopra. Uno studio inglese effettuato su una popolazione di 250 pazienti diabetici ha infatti dimostrato una differenza statisticamente significativa nei livelli di IGF-I

circolanti, risultati in questo caso più bassi nei pazienti carriers dell'allele 19 rispetto ai non carriers. Inoltre non sono state trovate differenze statisticamente significative in relazione al metabolismo glucidico rispetto genotipo, suggerendo quindi che polimorfismi di questa regione non siano funzionalmente importanti (Frayling, 2002); tale risultato risulta essere sovrapponibile a quello di un altro lavoro eseguito su un gruppo di 171 pazienti con osteoporosi idiopatica (Rosen, 1998). Ulteriori successivi studi (Allen, 2002) hanno dimostrato l'assenza di rapporti tra i livelli di IGF-I circolanti e il numero di CA repeat nella regione del promotore mentre, negli stessi anni, altri studi con popolazioni ancora diverse (pazienti affette da k mammella e pazienti sani) hanno invece suggerito la presenza di una correlazione inversa tra il numero di ripetizioni CA nella regione del promotore e il livello di IGF-I circolanti (Yu, 2001; Missmer, 2002). L'ipotesi che possa spiegare tali discrepanze è probabilmente legata al fatto che gli studi effettuati hanno puntato a correlare i livelli di IGF-1 al rischio di sviluppare malattie cardio-metaboliche, (Rietveld, 2004; Schut, 2003; Vaessen, 2001), mantenendo come ipotesi sottostante che normali livelli di IGF-I circolanti siano protettivi per questo gruppo di malattie e valutando tale correlazione su una popolazione di soggetti già affetti da tali patologie, peraltro in maniera retrospettiva.

In sintesi l'effettivo ruolo di questo polimorfismo sulla presentazione clinica dei pazienti è ancora poco chiaro anche a causa del fatto che questo microsatellite si trova soltanto 1 kb a monte del sito di inizio trascrizione dove sono presenti alcuni elementi regolatori (McCharty, 98). Diversi autori hanno infatti ipotizzato che i diversi fenotipi clinici osservati siano dovuti al fatto che la regione del promoter contenga tali elementi regolatori e che le variazioni alleliche presenti possano essere responsabili di differenze nella trascrizione con conseguente aumento dell'emivita e/o della stabilità della proteina (Yakar, 2002; West, 1996; McCharty, 1998).

### **3.4 Polimorfismo 19(CA) repeat e acromegalia.**

Inaspettatamente, fino ad oggi vi è un solo studio in letteratura inerente alla presentazione clinica dei pazienti acromegalici legati al polimorfismo CA (Akin, 2010).

In questo studio Akin ha dimostrato che i pazienti acromegalici che presentano 19 o più CA repeat mostrano livelli circolanti più elevati di IGF-I, LDL e un aumentato indice HOMA rispetto ai pazienti affetti dalla stessa patologia ma che all'analisi genetica presentano un numero inferiore di CA repeats. Inoltre, i dati di questo studio suggeriscono che gli elevati livelli di IGF-I in questo gruppo di pazienti siano correlati alla necessità di una terapia medica più aggressiva. Infatti, nei pazienti che sono stati sottoposti a terapia con analoghi della somatostatina, che presentano almeno un allele 19, risultano necessari dosaggi più elevati per mantenere i livelli di IGF-I nell'intervallo normale.

## **MATERIALI E METODI**

### **1. Pazienti inclusi nello studio e database**

Lo scopo di questo studio è quello di valutare un'eventuale influenza del polimorfismo 19 CA della regione del promoter dell'IGF-I in un gruppo di 88 pazienti acromegalici (M=37, F=51; età media  $42.3 \pm 1.4$ ) afferenti al nostro Istituto. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato per l'inserimento nello studio.

E' stato istituito un apposito database nel quale sono stati valutati i seguenti parametri clinici e antropometrici alla diagnosi e all'ultimo follow up nel 2012:

-polimorfismo regione promoter IGF-I;

-esami ormonali basali o sotto stimolo (in particolare IGF-I, IGF-I SDS, GH media basale, GH dopo test di soppressione con carico orale di glucosio 75 gr(OGTT),, PRL, ACTH, LH, FSH, TSH e ormoni da essi regolati);

-profilo lipidico: colesterolo totale, HDL, trigliceridi e calcolo LDL;

-metabolismo glucidico con prelievo basale per glicemia o dopo OGTT, HbA1C, calcolo HOMA e QUICKY ;

-BMI ( peso in kg / altezza in metri al quadrato),

-neuroimaging dell'adenoma mediante risonanza magnetica nucleare (RMN) o tomografia assiale computerizzata (TAC) della regione ipotalamo-ipofisaria), con valutazione delle dimensioni dell'adenoma, della invasione intra o extrasellare e del possibile interessamento dei seni cavernosi.

-altre terapie eventuali come radioterapia convenzionale frazionata o gamma knife;

-terapia medica eventuale (dopaminoagonisti, analoghi della somatostatina o antagonisti del GH) e rispettivi dosaggi.

I pazienti sono stati poi suddivisi in tre gruppi in base al genotipo 19/19, <19 e >19.

E' stato inoltre analizzato il genotipo di 98 soggetti sani tramite la medesima metodica per confrontare la frequenza dei diversi alleli nelle due popolazioni.

## **2.DETERMINAZIONE DEL GENOTIPO**

### **2.1 Estrazione di DNA da sangue**

Il DNA genomico è stato isolato da campioni di sangue periferico dei pazienti, utilizzando il kit Nucleon BACC2, Amersham Life Science Europe, Milan, Italy. In particolare, a 3ml di sangue intero di ciascun paziente sono stati aggiunti 11 ml di una soluzione di lisi per i globuli rossi; subito dopo ciascuna falcon è stata centrifugata a 3500 rpm per 5 minuti in modo da ottenere un pellet costituito principalmente dalle cellule nucleate del sangue, quali linfociti e monociti. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 2 ml di una soluzione capace di lisare la popolazione leucocitaria, e questo ha permesso di ottenere una sospensione contenente il DNA estratto dalle cellule, frammenti di membrana e proteine: per purificare il DNA da questi inquinanti sono stati addizionati 500 µl di sodio perclorato e subito dopo 2 ml di cloroformio. Successivamente sono stati introdotti 300 µl di resina e subito dopo ciascun campione è stato centrifugato a 3500 rpm per 3 minuti: al surnatante così ottenuto sono stati aggiunti 2 volumi di etanolo assoluto freddo per favorire la precipitazione del flocculo di DNA, il quale è stato subito dopo trasferito con una Pasteur in una provetta pulita contenente H<sub>2</sub>O. A questo punto il DNA è stato lavato con 600 µl di etanolo freddo e centrifugato a 13000 rpm per 3 minuti: il pellet ottenuto è stato quindi asciugato e risospeso in un opportuno volume di H<sub>2</sub>O, in base alla quantità ottenuta; quindi il DNA di ciascun campione è stato utilizzato per l'analisi.

## 2.2 PCR e analisi dei microsatelliti

Per la reazione di PCR sono stati impiegati due specifici primer, uno dei quali fluorescente (necessario per la successiva elettroforesi capillare e lettura del microsatellite) con le caratteristiche indicate nella seguente tabella:

<b>PRIMER</b>	<b>IGF-I 19 (CA) F FLUO</b>	<b>IGF-I 19 (CA) R</b>
<b>SEQUENCE</b>  <b>(5' TO 3')</b>	GCT AGC CAG CTG GTG TTA TT	ACC ACT CTG GGA GAA GGG TA
<b>Molweight(<math>\mu\text{G}/\mu\text{mol}</math>)</b>	6140	6192
<b>Micromolar extinction Coef (OD / <math>\mu\text{mol}</math>)</b>	211.4	231.9
<b>PURITY</b>	DESALTED	DESALTED
<b>Tm (1 M na+)</b>	68	70
<b>Tm (50nM Na+)</b>	47	49
<b>% GC</b>	50	55

**Tab. 2** .Caratteristiche dei primers utilizzati

Per la reazione è stata utilizzata la Platinum Taq DNA (5 U/microl) Invitrogen®.

### MIX DI REAZIONE DELLA PCR:

buffer Plat	2.5 $\mu$ l
MgCl	0.75 $\mu$ l
dNTPS	1.5 $\mu$ l
PrimerIGF-I F	0.6 $\mu$ l
PrimerIGF-I R	0.6 $\mu$ l
Taqplat	0.1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	18.45 $\mu$ l
DNA	1.5 $\mu$ l
<b>TOT</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

### PROGRAMMA DELLA PCR:

96°C	5 minuti	→ 1 ciclo
95°C	30 secondi	} 35 cicli
60°C	30 secondi	
72°C	30 secondi	
72°C	5 minuti	→ 1 ciclo

Dopo l'amplificazione i prodotti ottenuti sono stati visualizzati grazie ad una corsa elettroforetica eseguita su un gel di agarosio all'1%.

L'agarosio è normalmente utilizzato per la separazione di frammenti di acidi nucleici aventi dimensioni tipicamente comprese tra 500 bp a 20 kb circa; con alcune variazioni

è possibile arrivare a separare anche frammenti parecchio più grandi. Il gel di agarosio, tipicamente usato per la separazione di acidi nucleici, viene preparato portando ad ebollizione l'agarosio in polvere mescolato al tampone.

#### PREPARAZIONE GEL DI AGAROSIO 1%:

gel grande: 100 µl di TAE 1X + 1 g di agarosio + 100 µl di etidio bromuro

gel piccolo: 50 µl di TAE 1X + 0.5 g di agarosio + 50 µl di etidio bromuro

#### CARICAMENTO DEL GEL:

campioni: 5 µl prodotto di PCR

1 µl colorante 10X

Il gel viene poi immerso completamente nel tampone. La migrazione dei campioni avviene in orizzontale verso il polo positivo (anodo) sulla base alla loro massa poiché il loro rapporto carica/massa è costante. La loro velocità di migrazione dipende da:

1. dimensioni dei frammenti
2. percentuale dell'agarosio nel gel
3. voltaggio applicato

Frammenti lineari più piccoli migrano più velocemente rispetto a quelli più grandi, mentre, a parità di peso molecolare, il DNA circolare migra più velocemente di un DNA lineare, in quanto assume una conformazione detta superavvolta (super coiled DNA). Per la rivelazione del campione si sfrutta la colorazione con etidio bromuro, una molecola fluorescente che contiene un gruppo planare capace di intercalarsi tra le coppie di basi del DNA, e che pertanto va trattato con cautela, in quanto mutageno. Il

colorante viene visualizzato irradiando il gel con raggi U.V. e selezionando l'emissione con un filtro rosso. Un transilluminatore consente la visualizzazione del gel e delle bande corrispondenti ai prodotti amplificati: l'immagine osservata può essere registrata su film fotografico o acquisita con fotocamere digitali e la sensibilità del rilevamento è solitamente superiore a 0.1 µg di DNA. Attraverso la visualizzazione del gel è possibile quindi verificare la buona riuscita del processo di amplificazione, il che presuppone non solo la presenza della banda di interesse, ma anche l'assenza di aspecifici e di contaminanti nel bianco, ovvero quel campione costituito da tutti i componenti normalmente presenti nella reazione di PCR, ad eccezione del DNA amplificato.

Dopo aver dunque visualizzato la corretta esecuzione della PCR 1µl di prodotto viene quindi caricato in una piastra con degli specifici markers di pesi molecolari noti per poi procedere all'analisi della dimensione/altezza/area dei picchi generati dalla corsa elettroforetica.

Prima e dopo il primo e l'ultimo picco eventuali frammenti non vengono analizzati.

In ogni pozzetto della piastra viene inserito:

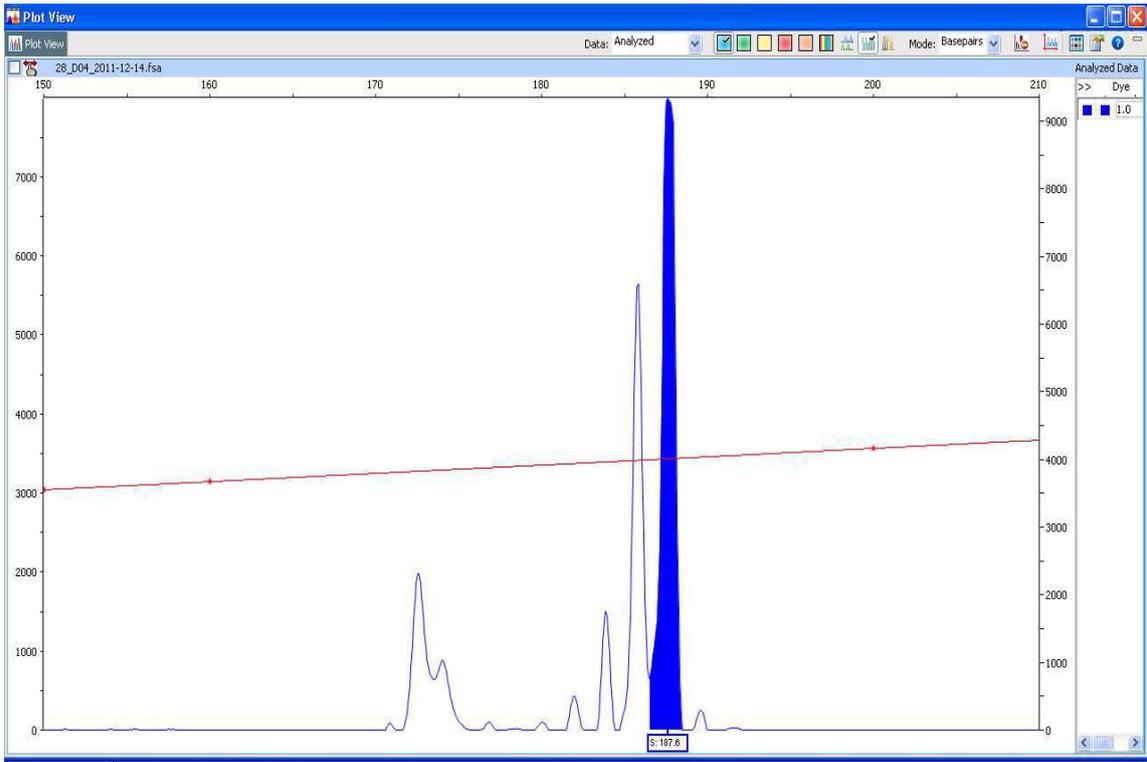
1µl di prodotto di PCR

0.2 µl di Gene ScanLiz 500-SIZE STANDARD (AppliedBiosystem®)

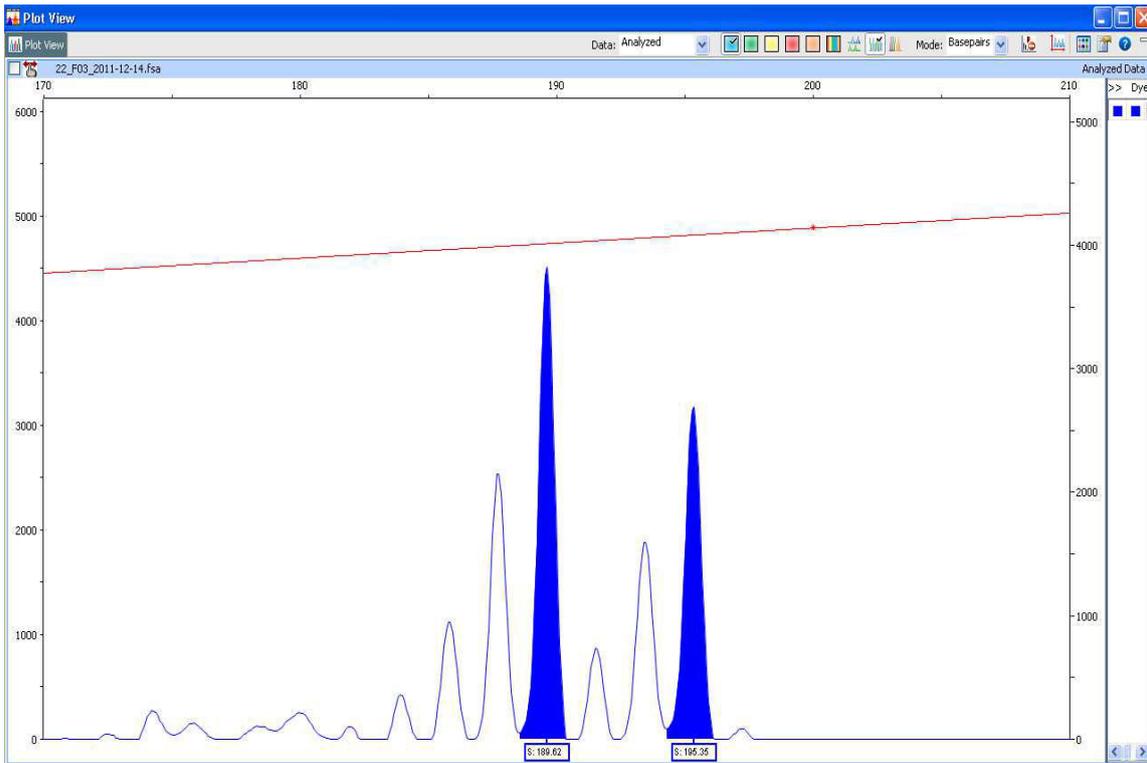
10 µl di formammide.

La piastra viene dunque analizzata con corsa standard (fino a 600bp) in capillari per elettroforesi.

Tutti gli elettroferogrammi delle vengono resi in formato .fsa, e quindi sono stati analizzati con il software Genescan.



**Fig. 10.** Analisi con il software Genescan : immagine di omozigosi per 19/19



**Fig. 11.** Analisi con il software Genescan : immagine di eterozigosi per 18/21

### 3.METODICHE DI DOSAGGIO

Fino al 1992 i livelli sierici di GH sono stati misurati con un metodo radioimmunologico (RIA) policlonale con il kit Lisophase HGH (Sclavo, Milano, Italia). La sensibilità era di 0.3 µg/litro e i coefficienti di variazione intra- e inter-dosaggio erano entrambi al di sotto di 10%. Gli standard erano calibrati sulla prima World Health Organization International Reference Preparation HGH-MCR (codice 66/217).

Successivamente i livelli di GH sono stati misurati attraverso un dosaggio immunofluorometrico monoclonale (IFMA), kit AutoDelfia (Wallac OY, Turku, Finlandia), con una sensibilità di 0.01 µg/litro e coefficiente di variazione intra- e inter-dosaggio rispettivamente del 2 e 1.7%. In questo caso gli standard erano calibrati con la prima World Health Organization International Reference Preparation (codice 80/505). L'equivalenza tra i due standard è certificata dai produttori (1 ng di 80/505 = 0.85 ng di 66/217).

Per quanto riguarda il dosaggio di IGF-I invece, a partire dal 1985 i livelli sierici di IGF-I sono stati misurati con una metodica RIA attraverso due differenti dosaggi.

Secondo il dosaggio usato prima del 1996 (Incstar, Stillwater, MN) la rimozione delle proteine di legame era ottenuta dalla acidificazione e conseguente filtrazione con cartucce ODS C18. I coefficienti di variabilità intra- e inter-dosaggio erano rispettivamente del 15 e 16%.

Successivamente è stato usato il kit della Mediagnost (Tübingen, Germania) e la separazione dell'IGF-I dalle proteine di legame era ottenuta tramite acidificazione in eccesso di IGF-II. I coefficienti di variabilità intra- e inter-dosaggio erano del 3.2 e 8.9% rispettivamente e la cross-reattività con l'IGF-II era meno dello 0.05%.

I risultati ottenuti con i due metodi avevano un coefficiente di correlazione dello 0.97 e i valori per i due dosaggi erano confrontati con l'appropriato range di età.

Metabolismo lipidico: I livelli di colesterolo totale, HDL e trigliceridi sono stati determinati con metodiche standard. La concentrazione di colesterolo LDL è stata calcolata applicando la formula di Friedwald solo per campioni con concentrazioni di trigliceridi inferiore a 300 mg/dl (Colesterolo LDL = Colesterolo Totale - (Colesterolo HDL + (trigliceridi / 5))).

Metabolismo glucidico: La glicemia e l'emoglobina glicata sono state valutate con metodiche standard; l'insulina con metodo immunoenzimatico "onestep". Il dosaggio di glucosio ed insulina è stato ripetuto sia in condizioni basali che dopo 2 ore dalla somministrazione di 75 gr di glucosio in 300-500ml di acqua per os (OGTT).

Il calcolo del HOMA (Homeostatic Model Assessment) che è un indicatore dell'insulino-resistenza è stato fatto utilizzando l'apposita formula:

HOMA index = glicemia x insulina / 405 dove la glicemia viene espresso in mg/dl mentre i valori di insulina in  $\mu$ U/mL (96).

Il calcolo del QUICKY (quantitative insulinsensitivitycheckindex ), indicatore dell'insulino sensibilità è l'espressione logaritmica dei valori del HOMA è stato calcolata con la formula :  $1 / (\log(\text{fastinginsulin } \mu\text{U/mL}) + \log(\text{fastingglucose mg/dL}))$ .

Le misurazioni di tutti i rimanenti parametri biochimici (PRL, ACTH, TSH, LH, FSH, cortisolo) sono state ottenute mediante le metodiche di routine.

#### **4.ANALISI STATISTICA**

Tutti i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (DS).

Le analisi sono state effettuate con l'ausilio del software statistico SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, USA). La forma della distribuzione delle variabili quantitative dello studio è stata valutata mediante ispezione diretta dei grafici di frequenza. Le variabili distribuite gaussianamente sono state confrontate mediante test t di Student o test ANOVA per più di due campioni. Le variabili senza distribuzione normale sono state valutate mediante test non parametrici: Mann-Whitney o Kruskal-Wallis per più di due campioni. Le variabili nominali sono state confrontate mediante test esatto di Fisher per tabelle di contingenza 2 x 2 e test  $\chi^2$  negli altri casi.

Le analisi di regressione lineare multivariata sono state effettuate con metodo di selezione "all'indietro" (backwardselection) con criterio di esclusione  $> 0.15$ . Le variabili nominali dicotomiche sono state codificate come 1: presenza della caratteristica e 0: assenza della caratteristica. Sono stati considerati significativi i valori di P inferiori a 0.05.

## **RISULTATI**

### **1. ANALISI DEL GENOTIPO**

La frequenza dei diversi alleli non è risultata differente nella popolazione acromegalica rispetto ai controlli. Sia nella popolazione sana che nella popolazione acromegalica sono stati determinati alleli comprendenti tra 17 e 22 ripetizioni CA. In particolare la frequenza dell'allele corrispondente a 17 ripetizioni è del 3.4% nella popolazione acromegalica e dell'1.5% nella popolazione sana e la frequenza di quello corrispondente a 18 ripetizioni è del 17% e del 10.7% rispettivamente. L'allele corrispondente a 19 ripetizioni, considerato "wild type" è presente con una frequenza del 54.5% nel gruppo di pazienti acromegalici e del 49% nel gruppo di controlli sani. Per quanto riguarda invece la frequenza degli alleli corrispondenti alle ripetizioni superiori a 19, l'allele 20 ha una frequenza del 22.1% nei pazienti acromegalici e del 20.4% dei controlli, l'allele 21 del 2.2% e 6% nei due gruppi ed infine l'allele corrispondente a 22 ripetizioni ha una frequenza del 0.56% nel gruppo dei pazienti acromegalici e dell'1% nel gruppo dei controlli.

## 2. VALUTAZIONE ORMONALE ALLA DIAGNOSI

I pazienti acromegalici sono stati divisi in tre gruppi in base al genotipo e da: gruppo A comprendente 25 pazienti (29.2%) omozigoti per l'allele 19 CA, gruppo B 36 pazienti (40%) con un numero di ripetizione della sequenza CA superiore a 19 (CA>19) e gruppo C comprendente 27 (30%) pazienti con numero di ripetizioni inferiore a 19 (CA<19).

	GENOTIPO	ACROMEGALICI% (n)
GRUPPO A	19/19	29.2% (25)
GRUPPO B	>19	40% (36)
GRUPPO C	<19	30% (27)

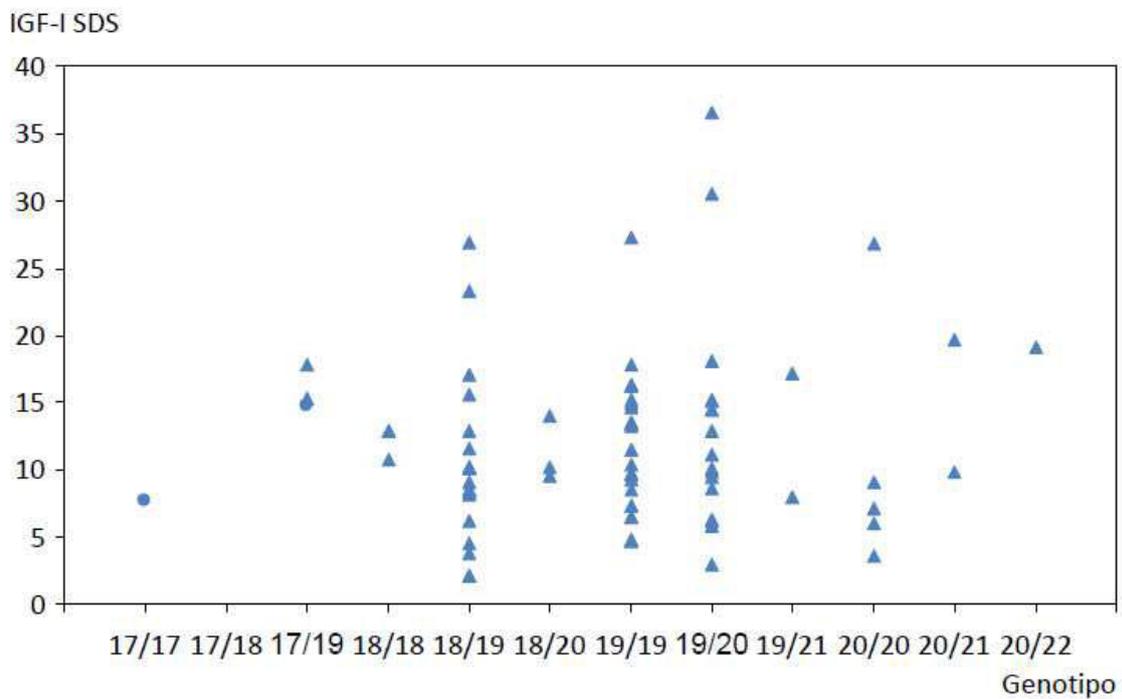
**Tab. 3.** Divisione in gruppi in base al genotipo

Il gruppo A è composto da cui 11 femmine e 16 maschi, con una età media al momento della diagnosi di 46 anni ( $\pm 15.9$ ); il gruppo B è composto da 25 femmine e 11 maschi, di età media 43.8 ( $\pm 12.9$ ) ed infine il gruppo C è composto da 15 femmine e 12 maschi di età media alla diagnosi 37.2 ( $\pm 12$ ). Alla valutazione neuroradiologica sono stati diagnosticati 13 (52%) macroadenomi nel gruppo A, 28 (77%) nel gruppo B e 18 nel gruppo C (66%). Non sono emerse differenze statisticamente significative confrontando i tre gruppi in merito alle dimensioni dell'adenoma, mentre confrontando l'età alla diagnosi del gruppo B e del gruppo C risulta significativamente più alta nel gruppo B ( $P=0.02$ ).

Tra i parametri ormonali valutati alla diagnosi non sono emerse differenze statisticamente significative nella maggioranza dei parametri valutati sia dal punto di vista ormonale che metabolico: in particolare per quanto riguarda i valori di IGF-I

circolanti (espressi in SDS) questi sono risultati totalmente sovrapponibili nei tre gruppi; nel gruppo A infatti la media risulta 11.5 ( $\pm 5.3$ ), nel gruppo B 12.4 ( $\pm 6.5$ ) ed infine nel gruppo C 11.2 ( $\pm 5.8$ ). Anche per quanto riguarda il GH nadir dopo test con carico orale di glucosio i valori risultano assolutamente sovrapponibili nei tre gruppi (gruppo A =  $20.9 \pm 28.4$ ; gruppo B =  $20.6 \pm 22$ ; gruppo C =  $23.5 \pm 28$ ).

Nella valutazione basale dei pazienti inseriti nello studio sono inoltre stati valutati i deficit di secrezione ipofisaria presenti in 4 (16%) pazienti del gruppo A, in 8 pazienti (22%) del gruppo B e 9 (33%) del gruppo C; senza individuare differenze significative nei tre gruppi. Tuttavia è comunque presente un evidente trend all'aumento delle IGF-I, come evidenziato dal grafico, che tuttavia non risulta significativo.



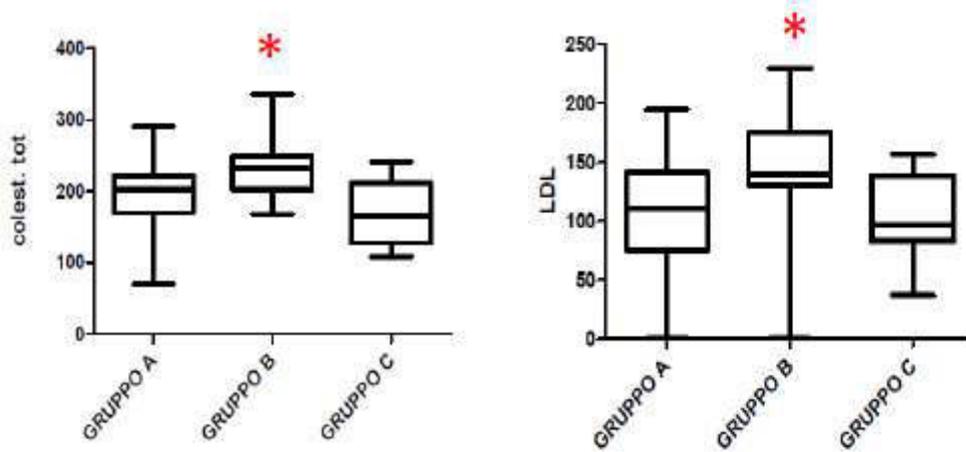
**Tab. 4.** Distribuzione IGF-I SDS in base al genotipo

### 3. VALUTAZIONE METABOLICA ALLA DIAGNOSI

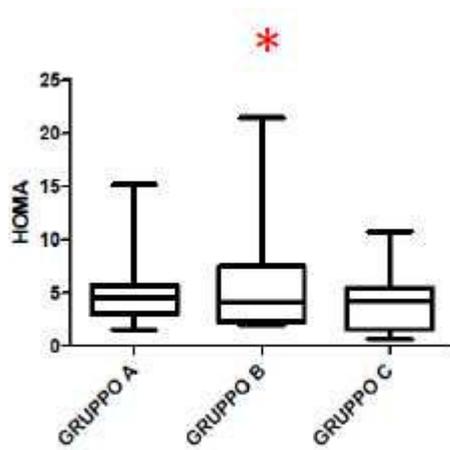
Dall'analisi dei parametri metabolici non sono emerse differenze statisticamente significative nei tre gruppi per quanto riguarda il BMI (gruppo A media 28.3( $\pm$ 3.5), gruppo B media 24.8( $\pm$ 5.2) e gruppo C media 26.7( $\pm$ 3.5)), e il metabolismo glucidico (in particolare glicemia basale, glicemia dopo OGTT, HbA1c, e calcolo Quicky); mentre è risultata statisticamente significativa la differenza dell'indice HOMA ( $p=0.01$ ), risultato significativamente superiore nel gruppo B (media 6.2 $\pm$ 5.9) rispetto ai gruppi A (media 5.0 $\pm$ 3.3) e C (media 4.0 $\pm$ 3.1). Anche per quanto riguarda il metabolismo lipidico è presente una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda i livelli di colesterolo totale e LDL risultati più alti ( $p=0.01$  e  $p=0.01$ ) nel gruppo B (media 233 $\pm$ 49 e 168.5 $\pm$ 46.6) rispetto al gruppo C (media 175.3 $\pm$ 43.4 e 104.0 $\pm$ 38.2).

	<b>Gruppo A media(SDS)</b>	<b>Gruppo B</b>	<b>Gruppo C</b>
<b>Glicemia 0'</b>	124.2 (63.2)	100.7 (24.4)	96.9 (15.6)
<b>Glicemia 120'</b>	144.1 (54.5)	136.5 (40.0)	127.7 (49.8)
<b>HbA1c</b>	6.4 (1.1)	5.7 (1.4)	5.9 (1.4)
<b>Insulina</b>	20.4 (13.2)	26.6 (25.4)	16.3 (11.3)
<b>HOMA *</b>	5.0* (3.3)	6.2* (5.9)	4.0* (3.1)
<b>Quicky</b>	0.294 (0.34)	0.3 (0.02)	0.3 (0.04)
<b>Colesterolo tot *</b>	199.5 (39.8)	233.9* (42.3)	175.3* (43.4)
<b>HDL</b>	45.2 (14.0)	46.2 (11.4)	39.7 (12.0)
<b>LDL *</b>	133.5 (35.1)	168.5* (46.6)	104.0* (38.2)
<b>Trigliceridi</b>	118.9 (44.9)	152.8 (84.2)	157.7 (85.6)

**Tab. 5.** Valutazione metabolica alla diagnosi



**Tab. 7-8.** Metabolismo lipidico: significative variazioni in colesterolo tot e LDL



**Tab. 9.** Metabolismo glucidico: significativa variazione nell'indice HOMA

### 3.OUTCOME

I pazienti inseriti nello studio sono stati seguiti negli anni dopo l'intervento presso la nostra U.O. con successivi follow up per la rivalutazione periodica dello stato della malattia e delle possibili complicanze ad essa associate. E' stato possibile in questo modo definire non soltanto la presentazione di malattia ma anche l'outcome globale al 2012 e la risposta alle terapie. Questi follow up sono stati effettuati ad una distanza compresa tra 1 e 29 anni, con una media di 8,8 anni ( $\pm 8,04$ ). Tra i pazienti del gruppo A 21 (84%) sono stati sottoposti a intervento chirurgico di asportazione dell'adenoma per via TNS e 8 (32%) sono stati sottoposti a terapia radiante (TC o radioterapia stereotassica  $\gamma$ knife), in un caso in sostituzione dell'intervento, e in 7 pazienti come ulteriore terapia dopo l'intervento chirurgico. Tra questi pazienti 7 (28%) risultano curati (1 paziente dalla sola radioterapia, 3 dal solo intervento e 3 dalla somma intervento + radioterapia). I 18 (72%) pazienti non curati sono tutti sottoposti ad una terapia farmacologica, 15 (83%) pazienti sono attualmente in trattamento con analoghi della somatostatina, 2 (11%) con pegvisomant, e 1 solo paziente (5%) con dopaminoagonisti.

Nel gruppo A solo 1 paziente risulta discrepante (5%), cioè con normalizzazione soltanto dei livelli di GH ma con IGF-I superiori ai limiti di norma.

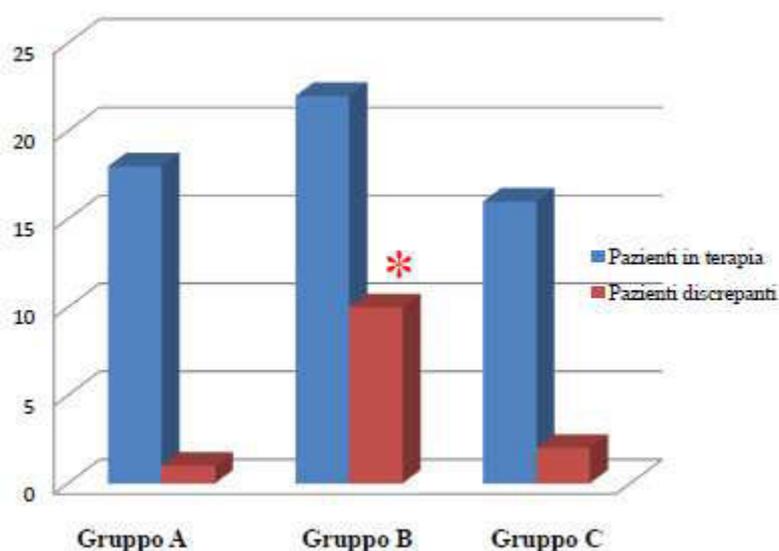
Nel gruppo B 33 pazienti (91%) sono stati sottoposti ad intervento per via TNS, mentre 3 pazienti (8.3%) sono stati sottoposti solo a terapia medica per controindicazioni all'intervento. 15 pazienti (45%), dopo l'intervento chirurgico, sono stati sottoposti a terapia radiante. All'ultimo follow up 14 pazienti (42.2%) risultavano curati (4 dal solo TNS e 10 dalla combinazione TNS + radioterapia). All'ultimo follow tra i 22 pazienti

(68%) non curati 17 (77%) sono in terapia con analoghi della somatostatina e 5 (23%), per resistenza a tale terapia, con pegvisomant.

Nel gruppo B 10 pazienti (27%) risultano discrepanti, cioè con normalizzazione soltanto dei livelli di GH ma con IGF-I superiori ai limiti di norma.

Infine, tra i pazienti del gruppo C 26 (96%) sono stati sottoposti a intervento chirurgico di asportazione dell'adenoma per via TNS e 12 (44%) sono stati sottoposti a terapia radiante (TC o radioterapia stereotassica  $\gamma$ knife), come ulteriore terapia dopo l'intervento chirurgico. Tra questi pazienti 15 (57%) risultano curati. I 16(59%) pazienti non curati sono tutti sottoposti ad una terapia farmacologica, 12(75%) pazienti sono attualmente in trattamento con analoghi della somatostatina e 4 (25%) con pegvisomant.

Nel gruppo C 2 pazienti risultano discrepanti (7%), cioè con normalizzazione soltanto dei livelli di GH ma con IGF-I superiori ai limiti di norma.



**Tab. 6.** Pazienti discrepanti nei tre gruppi rispetto al totale dei pazienti in terapia

All'analisi statistica dei dati relativi all'ultimo follow up, non sono emerse differenze significative sia nella risposta alla terapia medica che chirurgica.

Risultato statisticamente significativo invece il rapporto tra il numero di pazienti discrepanti nei tre gruppi, risultato significativamente più alto nel gruppo B rispetto al gruppo A ( $p=0.02$ ) e C ( $p=0.05$ ).

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Il nostro studio è il primo ad analizzare con precisione la possibile influenza del polimorfismo 19 CA della regione del promoter dell'IGF-I nella presentazione clinica dei pazienti acromegalici. Infatti un solo studio in precedenza ha indagato il ruolo di questo polimorfismo nei pazienti acromegalici, suggerendo una correlazione tra i livelli di IGF-1 alla diagnosi e numero di repeats, presentando tuttavia alcuni limiti metodologici e interpretativi. Infatti, lo studio di Akin e colleghi pubblicato nel 2010 si è proposto di analizzare dati biochimici e antropometrici in una popolazione di 34 pazienti acromegalici, utilizzando una diversa metodica per la determinazione del genotipo dei pazienti inclusi nello studio. Infatti i tre gruppi <192, 192-194 e >194 sono stati determinati semplicemente mediante PCR e successiva corsa su gel di agarosio al 3.5%. Dalla lettura dopo la corsa su gel gli autori hanno diviso i tre sottogruppi in base alla differente altezza delle bande. Nel nostro studio invece il numero di CA repeat è stato analizzato in maniera più approfondita dal momento che il prodotto di PCR, è stato analizzato mediante la tecnica dei microsatelliti e, nei casi che ancora risultavano dubbi, sequenziato. E' quindi chiaro come nel nostro studio siamo riusciti ad ottenere una precisa genotipizzazione dei pazienti, non possibile forse con la metodica utilizzata da Akin e colleghi. Alcune delle differenze tra i risultati del nostro studio e quello di Akin e colleghi sono forse imputabili proprio alla caratterizzazione del genotipo: non esistono nella nostra casistica differenze nella distribuzione degli alleli tra il gruppo di pazienti acromegalici e il gruppo dei controlli.

I dati in nostro possesso suggeriscono che il polimorfismo analizzato non influenzi i livelli di IGF-I, come invece afferma lo studio di Akin, dove vengono correlati livelli di IGF-I più alti in pazienti con un numero di CA repeat superiori a 19. Anche in questo

tuttavia il nostro studio si differenzia dallo studio di Akin per metodologia. Nella casistica di Akin infatti i livelli di IGF-I sono stati analizzati come valore assoluto e non come IGF-I SDS come invece eseguito nel nostro studio.

Dall'analisi dei dati in nostro possesso possiamo affermare che sebbene non esista una stretta correlazione tra il genotipo e i livelli di IGF-I circolanti alla diagnosi, come già descritto da numerosi studi precedenti (Rosen, 1998; Allen, 2002; Frayling, 2002), esistono delle differenze per quanto riguarda il metabolismo glucidico, lipidico e la risposta alla terapia in base al genotipo.

Infatti i nostri dati mostrano, in accordo a quanto già descritto da altri autori (Vaessen, 2001; Schut, 2003; Rietveld, 2004), che i pazienti con un maggior numero di ripetizioni mostrano un peggior metabolismo lipidico e glucidico rispetto agli altri pazienti. Nella nostra casistica in particolare i livelli di colesterolo totale e LDL risultano significativamente superiori nel gruppo dei pazienti con più di 19 ripetizioni rispetto agli altri gruppi, così come risulta aumentato l'indice HOMA.

Ulteriormente in accordo con la letteratura, i dati in nostro possesso ci portano a confermare la possibile influenza di questo polimorfismo non tanto sui livelli circolanti di IGF-I, ma sugli effetti periferici. Una possibile spiegazione a questo evento potrebbe essere confermata dalla funzione della regione promoter, che come ipotizzato da alcuni autori, conterrebbe elementi regolatori sulla stabilità e l'emivita della proteina, per cui un aumentato numero di CA repeat corrisponderebbe ad una aumentata emivita della stessa (Rosen, 2002; McCharty, 1998; West, 1996). Questa ipotesi funzionale del polimorfismo renderebbe ragione anche del nostro ulteriore interessante risultato sui pazienti in terapia: infatti nella nostra casistica risulta statisticamente significativa la

presenza di pazienti “discrepanti”, con normalizzazione cioè dei livelli di GH in terapia con analoghi della somatostatina, ma non dei livelli di IGF-I.

Questo dato in particolare riveste particolare interesse a livello clinico, dal momento che non è ancora presente un accordo in letteratura sull’appropriato management di questi pazienti (Brzana, 2011).

A partire da questi dati preliminari potrebbe dunque essere interessante analizzare su casistiche più ampie e multicentriche per analizzare la presenza e l’influenza di questo polimorfismo sia sui pazienti con diagnosi di acromegalia in terapia farmacologica, che sui numerosi pazienti con elevati livelli di IGF-I con normale soppressione del GH dopo OGTT.

## **BIBLIOGRAFIA**

**Melmed S.** Medical progress: Acromegaly. *N. Eng. J. Med.* 2006; 14:2558-2573.

**Faglia G.,** Arosio M., Bazzoni N. Ectopicacromegaly. *EndocrinolMetabClin North Am.* 1992;21:575-95.

**Spada A.,** Vallar L., Faglia G. G proteinoncogenes in pituitary tumors. *Trend Endocrinol. Metab.* 1992;3, 355-60

**Ezzat S.,** Forster M.J., Berchtold P., Redelmeier D. Acromegaly: clinical and biochemical features in 500 patients. *Medicine* 1994;73:233-240

**Holdaway I.M.,** Rajasoorya R.C. Epidemiology of acromegaly. *Pituitary* 1999;2:29-41.

**Ben-Shlomo A.** Melmed S. *EndocrinolMetabClin North Am.* 2008 Mar; 37 (1): 101-222.

**Colao A.,** Ferone D., Marzullo P., Lombardi G. Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management. *Endocr Rev.* 2004 25:102-52.

**Arosio M.,** Sartore G., Rossi C.M., Casati G., Faglia G., Manzato E. 2000 LDL physical properties, lipoprotein and Lp(a) levels in acromegalic patients. Effects of octreotide therapy. Italian MulticenterOctreotide Study Group. *Atherosclerosis* 151:551-557.

**Orme SM,** McNally RJ, Cartwright RA, Belchetz PE. Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. United Kingdom Acromegaly Study Group. *J ClinEndocrinolMetab.* 1998 Aug;83(8):2730-4.

**Molitch ME.** Clinical manifestation of acromegaly. *EndocrinolMetabClin North Am.* 1992;21:597-614.

**Nabarro JD.** Acromegaly. *ClinEndocrinol (Oxf).* 1987;26:481-512.

**Cordero R.A.,Barkan A.L.** Current diagnosis of acromegaly. *RevEndocrMetabDisord.* 2008 Mar;9 (1): 13-9.

**Giustina A.,** Chanson P., Bronstein M. D., Klibanski A., Lamberts S., Casanueva F. F., Trainer P., Ghigo E., Ho K., and Melmed S. A Consensus on Criteria for Cure of Acromegaly *J ClinEndocrinolMetab*, 2010, 95(7):3141–3148.

**Charmicael J.D., Vivien S.B.** Medical therapy: Option and uses. *EndocrinolMetabol* (2008) 9:71-81.

**Melmed S.,Colao A., Barkan A., Molitch M., Grossman A.B.,Kleinberg D., Clemmons D., Chanson P., LawsE., Schlechte J., Vance M.L., Ho K., Giustina A.** Guidelines for acromegaly management: an update. *J ClinEndocrinolMetab* 2009;10.1210/jc.2008-20041.

**Ben-Shlomo A. Melmed S.** *EndocrinolMetabClin North Am.* 2008 Mar; 37 (1): 101-222.

**Carmichael JD,** Bonert VS, Mirocha JM, Melmed S The utility of oral glucose tolerance testing for diagnosis and assessment of treatment outcomes in 166 patients with acromegaly. *J ClinEndocrinolMetab* 2009 94:523–527

**Trainer PJ**, Drake WM, Katznelson L, Freda PU, Herman-Bonert V, van der Lely AJ, Dimaraki EV, Stewart PM, Friend KE, Vance ML, Besser GM, Scarlett JA, Thorner MO, Parkinson C, Klibanski A, Powell JS, Barkan AL, Sheppard MC, Malsonado M, Rose DR, Clemmons DR, Johannsson G, Bengtsson BA, Stavrou S, Kleinberg DL, Cook DM, Phillips LS, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Hackett S, Zib K, Bennett WF, Davis RJ Treatment of acromegaly with the growth hormone-receptor antagonist pegvisomant. *N Engl J Med* 2000 342: 1171–11731.

**Lau SL**, McGrath S, Evain-Brion D, Smith R Clinical and biochemical improvement in acromegaly during pregnancy. *J Endocrinol Invest* 2008 31:255–261.

**van der Klaauw AA, Pereira AM, van Thiel SW, Frolich M, Iranmanesh A, Veldhuis JD, Roelfsema F, Romijn JA** Attenuated pulse size, disorderly growth hormone and prolactin secretion with preserved nyctohemeral rhythm distinguish irradiated from surgically treated acromegaly patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007 66:489–498.

**Freda PU** Monitoring of acromegaly: what should be performed when GH and IGF-1 levels are discrepant? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009 71:166–170.

**Bianchi A, Giustina A, Cimino V, Pola R, Angelini F, Pontecorvi A, De Marinis L** Influence of growth hormone receptor d3 and full-length isoforms on biochemical treatment outcomes in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 94:2015–2022

**Giustina A., Barkan A., Casanueva F.F., Cavagnini F., Lawrence F., Ho K., Veldhuis J., Wass J., Werder K., Melmed S.** Criteria for cure of acromegaly: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:526-529.

**Boeving A, Borba LA, Rodrigues AM, Orichowski EB, Paz Filho GJ; Santos GM, Boguszewski CL.** Outcome of surgical treatment for acromegaly performed by a single neurosurgeon and cumulative meta analysis. *Endocrinol Metabol.* 2006 Oct;50(5):884-892.

**Ludecke DK, Abe T.** Transsphenoidal microsurgery for newly diagnosed acromegaly: a personal view after more 1.000 operations. *Neuroendocrinology* 2006 ;83:230-239.

**Losa M, Mortini P, Urbaz L, Ribotto P, Castrignanó T, Giovanelli M.** Presurgical treatment with somatostatin analogs in patients with acromegaly: effects on the remission and complication rates. *J Neurosurg.* 2006 Jun;104(6):899-906.

**Laws E.R.** Surgery for acromegaly: evolution of techniques and outcomes. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008 Mar;9(1):67-70

**Thorner MO** Controversy: radiotherapy for acromegaly. *Clin Endocrinol* 2003;58:136-7

**Ronchi CL, Attanasio R, Verrua E, Ferrante E, Loli P, Montefusco L, Motti E, Ferrari DI, Giugni E, Beck-Peccoz P, Arosio M.** Efficacy and tolerability of gamma kniferadiosurgery in acromegaly: a 10-year follow-up study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009 Dec;71(6):846-52.

**Attanasio R**, Epaminonda P, Motti E, Giugni E, Ventrella L, Cozzi R. Gamma kniferadiosurgery in acromegaly: a 4 year follow up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;105-12.

**Charmicael J.D.**, Vivien S.B. Medical therapy: Option and uses. *Endocrinol Metabol* (2008) 9:71-81.

**Freda PU**. Somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3013-8.

**Cannavo S.**, Squadrito S., Curto L., Almoto B., Trimarchi F. Effectiveness of slow-release lanreotide in previously operated and untreated patients with Gh-secreting pituitary macroadenoma. *Horm Metab Res* 2001;33:618-24.

**Colao A**, Auriemma RS, Galdiero M, Lombardi G, Pivonello R. Effects of initial therapy for five years with somatostatin analogs for acromegaly on growth hormone and insulin-like growth factor-I levels, tumor shrinkage, and cardiovascular disease: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 ;94(10):3746-56.

**Jallad RS**, Musolino NR, Kodaira S, Cescato VA, Bronstein MD. Does partial surgical removal influence the response to octeotride-LAR in acromegalic patients previously resistant to the somatostatin analogue? *Clin Endocrinol*. 2007 Aug; 67(2):310-5.

**Colao A.**, Ferone D., Marzullo P., Lombardi G. Systemic complications of acromegaly: epidemiology, pathogenesis, and management. *Endocr Rev*. 2004 25:102-52.

**Chanson P**, Leselbaum A, Blumberg J, Schaison G. Efficacy and tollerability of the long acting somatostatin analog lanreotide in acromegaly. A 12 month multicenter study

of 58 acromegalic patients. French multicenter study group on lanreotide in acromegaly. *Pituitary* 2000;2:269-276.

**Stewart PM** .Pegvisomant: an advance in clinical efficacy in acromegaly. *Eur J Endocrinol* 2003;148 suppl 2:s27-32.

**Ho KK**. Place of pegvisomant in acromegaly. *Lancet* 2001;358:1743-4.

**Trainer PJ**, Drake WM, Katznelson L, Freda PU, Herman-Bonert V, Van der Lely AJ, Treatment of acromegaly with the growth hormone receptor antagonist pegvisomant. *N Engl J Med* 2000;342:1171-7.

**Lewis U.J.**, Dunn J.T., Bonewald L.F., Seavey B.K., Vanderlaan W.P., A naturally occurring structural variant of human growth hormone, *J. Biol. Chem.* 1978 .253 2679–2687.

**Brabanta G.**, von zurMühlerna A., Wüsterb C., Rankec M.B., Kratzschd J., Kiessd W., Ketelslegerse J-M., Wilhelmsenf L., Hulthénf L., Sallerg B., Mattssong A., Wildeh J., Schemerh R., Kanni P., On behalf of the German KIMS Board, Serum Insulin-Like Growth Factor I ReferenceValues for an Automated Chemiluminescence Immunoassay System: Results from a Multicenter Study,*Horm Res* 2003 ;60:53–60 .

**Kerrigan J.R.** &Rogol A.D. The impact of gonadal steroid hormone action on growth hormone secretion during childhood and adolescence. *Endocrine Reviews*,1992. 13, 281–298

**Udo J. Meinhardt** and Ken K. Y. Ho, Modulation of growth hormone action by sex steroids, *Clinical Endocrinology*, 2006. 65, 413–422 .

**Humbel ER.** Insulin-like growth factors I and II *Eur. J. Biochem.* 1990 .190,445 -462.

**Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG.** The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* 1999; 20(6):761-87.

**Werner H,** and Maor S. The insulin-like growth factor 1 receptor gene: a downstream target for oncogene and tumor suppressor action. *Trends EndocrinolMetab.* 2006. 17:236-242.

**Saito C,** Igarashi A and Viroli M. Lightweight family polymorphism *Journal of Functional Programming* 2008, pp 285 – 331.

**VaessenN,**Heutink P, Janssen JA, Witteman JCM, Testers L, Hofman A, Lamberts SWJ, Oostra BA, Pols H.A., van Duijn C.M Functional Properties and Risk for Type 2 Diabetes and Myocardial Infarction *Diabetes.* 2001 Mar;50(3):637-42.

**Rietveld I,** Janssen J.A.,. van Rossum E.F, Houwing-Duistermaat J.J., Rivadeneira F,

Hofman A., Pols H.A.,. van Duijn C.M, Lamberts S.W., A polymorphic CA repeat in the IGF-I gene is associated with gender-specific differences in body height, but

has no effect on the secular trend in body height, *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 61 (2004)

195–203.

**Frayling T.M.**, Hattersley A.T., McCarthy A., Holly J., Mitchell S.M., Gloyn A.L., Owen, D. Davies K., Smith G.D., Ben-Shlomo Y., A putative functional polymorphism in the IGF-I gene association studies with type 2 diabetes, adult height, glucose tolerance, and fetal growth in UK populations, *Diabetes* 2002- 2313–2316.

**Rosen CJ**, Kurland ES, Vereault D, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY, Witte S, Rogers J, Bilezikian JP. Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density. *J ClinEndocrinolMetab.* 1998 Jul;83(7):2286-90.

**Allen N.E.**, Davey G.K., Key T.J., Zhang S., Narod S.A., Serum insulin like growth factor I (IGF-I) concentration in men is not associated with the cytosine–adenosine repeat polymorphism of the IGF-I gene, *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 2002 319–320.

**H. Yu**, B.D. Li, M. Smith, R. Shi, H.J. Berkel, I. Kato, Polymorphic CA repeats in the IGF-I gene and breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 70 (2001) 117–122.

**Missmer SA**, Haiman CA, Hunter DJ, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Pollak MN, Hankinson SE. A sequence repeat in the insulin-like growth factor-1 gene and risk of breast cancer. *Int J Cancer.* 2002 Jul 20;100(3):332-6.

**Schut A.F.**, Janssen J.A., Deinum J., et al., Polymorphism in the promoter region of the insulin-like growth factor I gene is related to carotid intima-media thickness and aortic pulse wave velocity in subjects with hypertension, *Stroke* (2003) 1623–1627.

**McCarthy TL**, Ji C, Shu H, Casinghino S, Crothers K, Rotwein P, Centrella M. 17beta-estradiol potently suppresses cAMP-induced insulin-like growth factor-I gene activation in primary rat osteoblast cultures. *J Biol Chem.* 1997 Jul 18;272(29):18132-9.

**West CA**, Arnett TR, Farrow SM. Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA variants in rat bone. *Bone.* 1996 Jul;19(1):41-6.

**Yakar S.**, Wu Y., Setser J., Rosen CJ. The role of circulating IGFI lessons from human and animal models . *Endocrine.* 2002 Dec;19(3):239-48.

**Akin F**, Turgut S, Cirak B, Kursunluoglu R. IGF(CA)19 and IGFBP-3-202A/C gene polymorphism in patients with acromegaly. *Growth Horm IGF Res.* 2010 Dec;20(6):399-403.

**Brzana JA**, Yedinak CG, Delashaw JB, Gultelkin HS, Cook D, Fleseriu M. Discordant growth hormone and IGFI levels post pituitary surgery in patients with acromegaly naïve to medical therapy and radiation: what to follow, GH or IGF-1 values? *Pituitary.* 2012 Dec;15(4):562-70.