



Artículo original

Alta prevalencia de un polimorfismo en el codón 422 del gene del receptor de hormona liberadora de hormona del crecimiento en pacientes mexicanos con acromegalia

Ernesto Sosa,* Victoria Mendoza,* Ana Laura Espinosa-de-los-Monteros,* Alfonso Ovalle,*
Irma Hernández,* Gerardo Guinto,* Mario Molina,* Moisés Mercado*

* Servicio de Endocrinología y Unidad de Investigación Médica en Endocrinología Experimental, Servicio de Neurocirugía, UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México.

Correspondencia:
Moisés Mercado
Aristóteles Núm. 68, Polanco, México
D.F. 11560, México. Teléfono y
fax: +5255-52813029 ó +5255-
55190457,
E-mail: mmercadoa@yahoo.com
moises.mercado@imss.gob.mx

Resumen

Antecedentes: La proliferación del somatotropo y su secreción hormonal dependen de la señalización apropiada de GHRH a través de un receptor heptahélico específico asociado a una proteína Gs. Condiciones como el adenoma tiroideo hiperfuncionante y la testotoxicosis resultan de mutaciones activadoras de receptores heptahélicos de la misma familia que el receptor de GHR. **Objetivo:** Realizamos una búsqueda dirigida de mutaciones activadoras del gene del GHRH-R en una serie amplia de tumores secretores de GH y en un número equivalente de adenomas no funcionantes de la hipófisis. **Diseño del estudio y metodología:** Se examinaron 44 adenomas hipofisarios productores de GH y 17 adenomas no funcionantes en busca de cambios moleculares en los exones 3, 7 y 13 del gene de GHRH-R mediante PCR y secuenciación directa. Los pacientes fueron seguidos clínica y bioquímicamente de manera prospectiva hasta por 6 años después de la cirugía. **Resultados:** Se encontró la sustitución de una sola base en el codón 422 (ATG a ACG) con patrón heterogéneo, en 54% de los tumores productores de GH, 23% de los adenomas no funcionantes y 40% de la sangre periférica de voluntarios sanos. La presencia de tal cambio, no estuvo relacionada con ningún hallazgo bioquímico o clínico en los pacientes, tampoco fue capaz de predecir el desenlace. **Conclusiones:** Aunque la prevalencia del cambio ATG por ACT en el codón 422 es alta en la población mexicana con acromegalia, su presencia en un número significativo de tumores no funcionantes y en controles, hace poco probable que participe de manera significativa en la patogénesis de los somatotropinomas.

Palabras clave: GHRH, receptor de GHRH, acromegalia.
Revista de Endocrinología y Nutrición 2008; 16(3): 114-119

Abstract

Background: The lack of a unifying etiologic explanation for all GH-secreting tumors has prompted a search that goes beyond the GSP oncogene. Somatotroph cell proliferation and hormonal secretion depend upon a proper GHRH signaling through specific heptahelic receptors. Activating mutations of other, related heptahelic receptors such as TSH receptor form the basis for hyperfunctioning thyroid adenomas. **Objective:** We sought to search for potentially activating mutations of the GHRH-R gene in a large number of GH-secreting tumors and in an equivalent number of non-

functioning adenomas. **Study design and methods:** Forty four GH-secreting pituitary adenomas and 17 non-functioning pituitary tumors (NFT) were examined for the presence of molecular changes in exons 3, 7 and 13 of the GHRH-R gene by PCR and direct sequencing. Patients were prospectively followed clinically and biochemically for up to 6 years after surgery. **Results:** A heterozygous, single base substitution resulting in an ATG to ACG change at codon 422 was found in 54% of GH-secreting adenomas, 23% of NFT and 40% in PBMC obtained from healthy subjects. The presence of such base change was not related to any clinical or biochemical feature of the patients, nor did it predict outcome. **Conclusions:** Although the prevalence of codon 422 ATG to ACT base change is high in our Mexican population with acromegaly, its presence in a significant proportion of non-functioning tumors and in controls, makes it unlikely that it participates in a significant manner in the pathogenesis of somatotropinomas.

Key words: Health-related quality of life, body mass index, questionnaires of health, physical capacity.

Revista de Endocrinología y Nutrición 2008; 16(3): 114-119

La proporción de adenomas hipofisarios productores de hormona de crecimiento (GH) que poseen el oncogen GSP varía entre las poblaciones estudiadas: hasta 40% en caucásicos,¹⁻³ cerca del 10% en pacientes asiáticos,⁴⁻⁶ y 19% en acromegálicos mexicanos.⁷ La presencia de este hallazgo molecular parece estar asociada con un comportamiento biológico menos agresivo, mayor sensibilidad a los análogos de somatostatina^{2,8,9} y una mayor probabilidad de alcanzar una GH "segura" en el seguimiento a largo plazo.⁷

La ausencia de una explicación etiológica en los adenomas secretores de GH negativos para la presencia del oncogen GSP, ha condicionado que la búsqueda se enfoque hacia otros genes candidatos. En diferentes poblaciones se han encontrado mutaciones del gene de la menina en acromegalia asociada a neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (NEM-1) y se ha encontrado pérdida de la heterocigosidad del locus 11q13, aunque no de manera consistente, en casos de acromegalia familiar y esporádica.^{10,11} También se han descrito alteraciones moleculares como el aumento de la vía de señalización del Pit1-CREB¹²⁻¹⁴ y el oncogen PTTG¹⁵⁻¹⁷ entre otros, pero no se ha probado una asociación directa entre ellos y la acromegalia.

La acción de la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), de origen hipotalámico a través de su receptor específico en las células somatotropas de la hipófisis, representa la principal señal estimuladora tanto para la producción de GH como para la proliferación celular. La posibilidad de que una mutación que condicione ganancia de la función del receptor de la GHRH (GHRH-R) pudiera originar o por lo menos contribuir a la formación de un adenoma ha sido motivo de investigación para diferentes grupos en la pasada década. De hecho, este escenario biológico es

una analogía con aquello que ocurre en otras condiciones endocrinas bien caracterizadas tales como el adenoma tiroideo hiperfuncionante –tóxico–, debido a mutaciones activadoras del receptor de TSH¹⁸⁻²¹ y el hipergonadismo de la testotoxicosis que resulta de mutaciones del receptor de LH.²²⁻²⁴ En un reporte previo²⁵ se sugirió que la sustitución de una sola base en los codones 57 y 422 del gene de GHRH-R, descubiertas en 5 de 20 tumores analizados, podrían provocar una activación constitutiva del receptor (Petersen, The Endocrine Society 82nd Annual Meeting Endo 2000). Por esta razón decidimos buscar mutaciones potencialmente activadoras en una serie grande de tumores productores de GH y en un número equivalente de adenomas no funcionantes, para determinar si estos cambios moleculares de verdad participan en la oncogénesis de la acromegalia o simplemente representan polimorfismos del receptor sin consecuencia funcional alguna.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Local de Ética del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado. Se estudiaron 44 pacientes con acromegalia. Este diagnóstico se realizó en pacientes con el cuadro clínico característico y se confirmó mediante la falta de supresión de GH por carga oral de glucosa a menos de 1 ng/mL además de niveles elevados de IGF-1 ajustados para edad y sexo. Se identificaron mediante imagen con resonancia magnética 34 macroadenomas y 10 microadenomas. A todos los pacientes se les realizó una neurocirugía hipofisa-

ria transesfenoidal y la naturaleza secretora de GH se confirmó con inmunohistoquímica. Se estudiaron además 17 pacientes con adenoma clínicamente no funcional de la hipófisis (MAHNF) así como 20 sujetos sanos. Se cuenta con los datos del seguimiento clínico y bioquímico de 38 de los 44 adenomas productores de GH que fueron estudiados genéticamente. Se registró la prevalencia de diabetes mellitus e hipertensión al diagnóstico. Se consideró que la acromegalia estaba remitida cuando se logró una GH suprimida por glucosa oral < 1 ng/mL y un IGF-1 normal ajustado para edad y género. Consideramos como "segura" una GH basal < 2.5 ng/mL. El índice de IGF-1 se calculó dividiendo el resultado del paciente por el nivel más alto del rango normal para edad y género, tal como se ha descrito previamente.²⁶

Ensayos hormonales

La GH se midió usando un ensayo inmunométrico quimioluminiscente de fase sólida, con dos anticuerpos monoclonales mediante un equipo automatizado (IMMULITE; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA), con límite de detección de 0.01 ng/mL y coeficientes de variación inter e intraensayo de 6%. El IGF-1 se midió usando un ensayo inmunoradiométrico de dos sitios (Diagnostic System Laboratory, Webster, TX) con paso previo de extracción con ácido-etanol de proteínas fijadoras y coeficientes de variación inter e intraensayo de 2.6% y 4.4% respectivamente. Los valores normales ajustados para edad y género en nuestra población fueron previamente reportados.²⁶

Estudio molecular

Muestras biológicas y extracción de DNA

Se recolectó un fragmento de tumor directamente en la sala de operaciones en 24 adenomas productores de GH y en los 17 MAHNF, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C hasta el momento de

la extracción de DNA por métodos estandarizados. El DNA de 20 somatotropinomas se obtuvo a partir de tejidos embebidos en parafina y de los sujetos sanos se obtuvo DNA a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

Identificación de mutaciones del GHRH-R

Se amplificaron productos de PCR que contenían los exones 3, 7 y 13 del gen del GHRH-R usando oligonucleótidos previamente descritos²⁷ (Cuadro I). El tamaño de los productos esperados fue confirmado por electroforesis en gel de agarosa al 2%, y las bandas fueron purificadas y secuenciadas directamente por el método modificado de terminación dideoxy (DNA Sequencing Kit, *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. ABI PRISM, PerkinElmer/Applied Biosystems). Cuando se detectó un cambio genético en una muestra de un paciente acromegálico, se realizó una búsqueda dirigida del exón alterado en DNA genómico de MAHNF y CMSP de sujetos sanos.

Análisis estadístico

La descripción de los datos nominales se presenta como porcentajes y las variables numéricas como medias \pm SEM. Se realizaron comparaciones con χ^2 y prueba exacta de Fisher para variables nominales y con la prueba U de Man-Whitney para variables numéricas. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

No se encontró ninguna mutación en los exones 3 y 7 del gene del GHRH-R en DNA genómico de los 44 somatotropinomas estudiados. La secuenciación directa del producto de PCR de 262 bp correspondiente al exón 13, mostró el cambio de una sola base en el codón 422 en 24 de los 44 tejidos tumorales de los pacientes con acromegalia (54.5%). Esta transición de ATG (tipo silvestre) a ACG ocasiona la sustitución de *metio-*

Cuadro I. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados y productos de PCR esperados.

Producto	Tamaño (bp)	Sentido	Antisentido
Exón 3	437	GACACCCAATGGCTTGGCTCAT	GAGGTGCTTCATCTGGAGTGCC
Exón 7	235	TGGGTGTCCCAGCTCTGAGCAC	TTGGGCACCATGGGGAGGTAAA
Exón 13	262	GACCTTCCTACGCTCTCTTC	GCCACATCCCCACCCAGCTG

nina por *treonina* en la posición 422, localizada en la porción terminal intracelular del GHRH-R. El patrón alélico fue heterocigoto en 18 tumores mientras que sólo 6 fueron homocigotos (Figura 1).

Se buscó este cambio de manera dirigida en el DNA genómico de 27 MAHNF y en CMSP de 20 voluntarios sanos y fue encontrado en 4 (23.5%) y 8 (40%) respectivamente. Los datos clínicos y bioquímicos estuvieron disponibles en 38 de los 44 acromegálicos después de un promedio de seguimiento de 59 meses (42 – 81). Las características clínicas y bioquímicas se muestran en el cuadro II. No hubo diferencia entre los pacientes con o sin el cambio genético ATG→ACG, con respecto a la edad, prevalencia de diabetes mellitus, hipertensión, o proporción con macroadenomas. Tampoco hubo diferencia entre las concentraciones promedio de GH basal o suprimida por glucosa al diagnóstico o en el seguimiento. Sólo 4 de 16 pacientes (25%) sin este cambio de una sola base alcanzaron tanto una GH nadir < 1 ng/mL como un índice de IGF-1 normal para edad y género, mientras que 8 de 22 (36%) con la forma ATG→ACG del GHRH-R lograron estos criterios de curación. También evaluamos la proporción de pacientes que alcanzaron una cifra "segura" de GH en la última evaluación: 56% del grupo WT y 63% del grupo portador del cambio ATG→ACG ($p = 0.64$). Un

fragmento del tumor de los 38 pacientes fue analizado en busca de la presencia del oncogen GSP- α y sólo fue encontrado en 5. En 4 de estos 5 tumores el oncogen GSP- α coexistió con la forma ATG→ACG del GHRH-R, pero no se encontró ninguna diferencia con respecto a los datos clínicos y bioquímicos, así como tampoco lo hicimos al evaluar el desenlace entre pacientes con o sin mutaciones GSP α (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

El oncogen GSP α , actualmente conocido como GNAS es un mecanismo patogénico, establece una clara asociación entre la proliferación celular y la hipersecreción hormonal autónoma. La baja penetrancia de este trastorno genético somático (prevalencias reportadas entre 6 y 40%) indica que deben existir otros mecanismos que expliquen el origen de la enfermedad. Cualquiera que sea el paradigma etiológico alternativo elegido, deberá poder unir estos dos aspectos fundamentales de los tumores endocrinos: hipersecreción hormonal y proliferación celular.

Es precisamente en este escenario biológico donde podemos situar a las mutaciones activadoras de los receptores heptahélicos asociados a proteínas Gs, sobre todo si consideramos situaciones análogas como

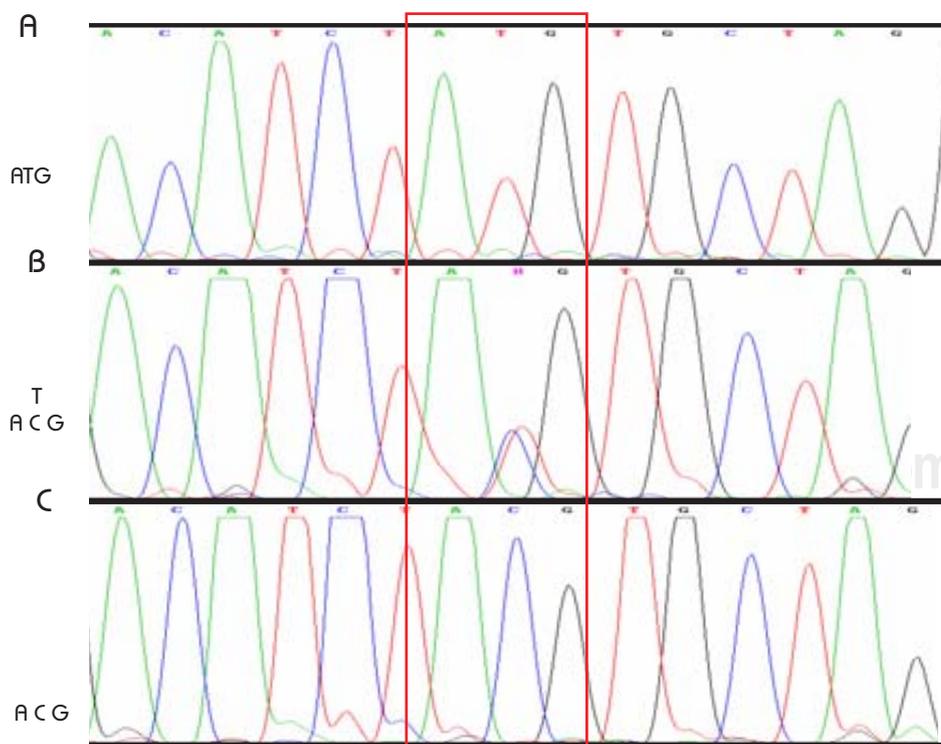


Figura 1. Secuenciación del exón 13 del gen del receptor de GHRH mostrando el tipo silvestre (A), y la mutación ATG→ACG en el estado heterocigoto (B) y homocigoto (C).

Cuadro II. Características al diagnóstico de los pacientes acromegálicos portadores del tipo silvestre (WT) o el polimorfismo 422 ATG \geq ACG del gene del GHRH-R. Se muestra también el desenlace de la enfermedad en un seguimiento promedio de 59 meses (rango 52-81).

	ATG (WT)	ATG \rightarrow ACG	ρ
N	16	22	—
Hombre/Mujer	3/13	11/11	—
Edad	42.3 \pm 9	39.5 \pm 9	0.36
GH Preop basal (ng/mL)	22.1 \pm 14.3	18.7 \pm 12.8	0.52
GH Preop nadir (ng/mL)	17.6 \pm 14.6	15.8 \pm 13.3	0.69
IGF-I Preop (ng/mL)	560.7 \pm 117.3	562.7 \pm 80.5	0.35
Diabetes mellitus (%)	18	18	0.96
Hipertensión (%)	43	27	0.29
Macroadenomas (%)	81	77	0.76
GH Postop basal (ng/mL)	5.9 \pm 2.8	2.27 \pm 0.52	0.83
GH Postop nadir (ng/mL)	4.16 \pm 2.2	1.39 \pm 0.42	0.80
IGF-1 Postop (ng/mL)	383.5 \pm 214.5	382 \pm 149.7	0.94
GH nadir < 0.3 (%)	43	37	0.64
GH nadir < 1.0 (%)	56	54	0.91
GH basal < 2.0 (%)	56	63	0.64
IGF-I Normalizado (%)	25	40	0.30
GH nadir < 1.0 e IGF-I normal (%)	25	36	0.28

el adenoma tiroideo hiperfuncionante y la testotoxicosis. La posibilidad de que las mutaciones con ganancia de la función en el gen de GHRH-R puedan participar en la oncogénesis de la acromegalia, ha sido estudiada previamente pero los resultados han sido conflictivos. Petersen et al (The Endocrine Society 82nd Annual Meeting Endo 2000) encontraron mutaciones puntuales en 2 diferentes codones en 3 de 15 adenomas productores de GH. La expresión *in vitro* de los constructos que contenían las mutaciones localizadas en los codones 422 y 57, revelaron una acumulación de cAMP incrementada tanto de forma basal como estimulada. Estos resultados fueron parcialmente confirmados por Adams et al,²⁶ quienes encontraron la mutación del codón 57 en 5 somatotropinomas y demostró en estudios de expresión que dicha mutación es de naturaleza activadora. Han sido publicados otros dos estudios que han buscado mutaciones del gene de GHRH-R. Salvatori et al²⁷ no encontraron cambios moleculares en 26 somatotropinomas (evaluados por SSCP), mientras que Lee²⁸ et al, encontraron 12 cambios puntuales (uno de ellos en el codón 423) mediante secuenciación directa en 54 tumores productores de GH, pero sin demostrar una consecuencia funcional, ni en términos de unión al ligando ni en cuanto a producción de cAMP.

El cambio de una sola base en la posición 422 se encontró en más de la mitad de nuestros pacientes. El

codón 422 de GHRH-R está localizado muy cerca del extremo aminoterminal de la molécula y está estrechamente asociado con la proteína G; por ello, es plausible que cambios moleculares localizados en esta área pudieran resultar en activación constitutiva. Aunque no realizamos estudios de expresión para establecer una consecuencia funcional de la mutación 422, el encontrarla en más del 50% de nuestros pacientes es notorio. Los acromegálicos con o sin la mutación 422 se comportaron de manera similar tanto clínica como bioquímicamente, y no encontramos ninguna diferencia en el desenlace a largo plazo entre estos dos grupos. Encontramos el mismo cambio de una sola base en un número significativo de MAHNF, por ello, parece poco probable que este evento constituya un mecanismo patogénico mayor en acromegalia. Desde el punto de vista étnico, nuestro grupo de pacientes es representativo de la población mexicana, la cual es mestiza en un 90%. El hallazgo del cambio en el codón 422 en células de sujetos sanos apoya el hecho de que este cambio molecular es simplemente un polimorfismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Harris PE. Gs protein mutation and the pathogenesis and function of pituitary tumor. *Metabolism* 1996; 45: 120-22.
2. Landis CA, Harsh G, Lyons J, Davis R, McCormick F, Bourne H. Clinical characteristics of acromegalic pa-

- tients whose pituitary tumors contain mutant Gs protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1416-20.
3. Spada A, Arosio M, Bochicchio D, Bazoni L, Vallar L, Bassetti M, Fraglia G. Clinical, biochemical and morphological correlates in patients bearing growth hormone secreting pituitary tumours with or without constitutively active adenyl cyclase. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1421-26.
 4. Hosoi E, Yokogoshi Y, H Oiré, Sano T, Yamada S, Saito S. Analysis of the gsp α gene in growth hormone-secreting pituitary adenomas by the polymerase chain reaction-direct sequencing method using paraffin-embedded tissues. *Acta Endocrinol* 1993; 129: 301-6.
 5. Yashimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Itakura M. Rare mutation of the gsp-alpha subunit gene in human endocrine tumor. *Cancer* 1993; 72: 1386-93.
 6. Yang I, Park S, Ryu M, Woo J, Kim S, Kim J, Kim Y, Choi Y. Characteristics of gsp-positive growth hormone-secreting pituitary tumors in Korean acromegalic patients. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 720-6.
 7. Mendoza V, Sosa E, Espinosa-de-los-Monteros AL, Salcedo M, Guinto G, Cheng S, Sandoval C, Mercado M. GSP α mutations in Mexican patients with acromegaly: potential impact on long term prognosis. *Growth Horm & IGF Res* 2005; 15: 28-32.
 8. Barlier A, Gunz G, Zamora AJ, Morange-Ramos I, Figarella-Branger D, Dufour H, Enjalbert A, Jaquet P. Prognostic and therapeutic consequences of Gs α mutations in somatotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1604-10.
 9. Buchfelder M, Fahlbush R, Merz T, Symowski H, Adams EF. Clinical correlates in acromegalic patients with pituitary tumors expressing GSP oncogenes. *Pituitary* 1999; 1: 181-5.
 10. Prezant T, Levine J, Melmed S. Molecular characterization of the MEN 1 tumor suppression gene in sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1388-91.
 11. Shimon I, Melmed S. Pituitary tumors pathogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1675-81.
 12. Heaney AP, Melmed S. New pituitary oncogenes. *Endocrine-related cancer* 2000; 7: 3-15.
 13. Boggild MD, Jenkinson S, Pistorello M, Boscaro M, Scanarini M, McTernan P, Perrett CW, Thakker RV, Clayton RN. Molecular genetic studies of sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 387-92.
 14. Pei L, Melmed S, Scheithauer B, Kovacs K, Benedict WF, Prager D. Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma susceptibility gene (RB) locus in aggressive pituitary tumors. Evidence of a chromosome 13 tumor suppressor gene other than RB. *Cancer Res* 1995; 55: 1613-16.
 15. Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-specific transferring gene. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 433-41.
 16. Zhang X, Horwitz GA, Prezant T. Structure, expression and function of human pituitary tumors transferring gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 1999; 13: 156-66.
 17. Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 761-7.
 18. Khoo DH, Parma J, Rajasooriya C, Ho SC, Vassart G. A germline mutation of the thyrotropin receptor gene associated with thyrotoxicosis and mitral valve prolapse in a Chinese family. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1459-62.
 19. Kopp P, Muirhead S, Jourdain N, Gu WJ, Jamesos JL, Rodd C. Congenital hyperthyroidism by a solitary toxic adenoma harboring a novel somatic mutation (serine281 \rightarrow isoleucine) in the extracellular domain of the thyrotropin receptor. *J Clin Invest* 1997; 100: 1634-39.
 20. Russo D, Tumino S, Arturi F, Vigneri P, Grasso G, Pontecorvi A, Filetti S, Belfiore A. Detection of an activating mutation of the thyrotropin receptor in a case of an autonomously hyperfunctioning thyroid insular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 735-8.
 21. Parma J, Van Sande J, Swillens S, Tonachera M, Dumont J, Vassart G. Somatic mutation causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutation activating both the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca²⁺ cascades. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 725-53.
 22. Nordhoff V, Gromoll J, Simoni M. Constitutively active mutations of G protein-coupled receptors: the case of the human luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors. *Arch Med Res* 1999; 30: 501-9.
 23. Beck-Peccoz P, Persani L, Romoli R, Asteria C, Borgato S. Activating mutations of the gonadotropin receptors. *Arch Pediatr* 1998; Suppl 4: 380S-4S.
 24. Gromoll J, Simoni M, Nordhoff V, Behre HM, De Geyter C, Nieschlag E. Functional and clinical consequences of mutations in the FSH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125: 177-82.
 25. Adams EF, Oikonomou E, Bhamrah M, Buchfelder M, Mitchell R, Poyner DR. A polymorphism in the growth hormone-releasing hormone receptor gene: clinical significance? *Regul Pept* 2002; 108: 125-28.
 26. Espinosa-de-los-Monteros AL, Mercado M, Sosa E, Lizama O, Guinto G, López-Félix B, García O, Hernández I, Ovalle E, Mendoza V. Changing patterns of insulin-like growth factor-I and glucose-suppressed growth hormone levels after pituitary surgery in patients with acromegaly. *J Neurosurg* 2002; 97: 287-92.
 27. Salvatori R, Thakker RV, Lopes MB, Fan X, Eswara JR, Ellison D, Lees P, Harding B, Yang I, Levine MA. Absence of mutations of the growth hormone releasing receptor gene in GH-secreting pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 54: 301-7.
 28. Lee EJ, Kotlar TJ, Ciric I, Lee MY, Lim SK, Lee HC, Huh KB, Mayo KE, Jameson JL. Absence of constitutively activating mutations in the GHRH receptor in GH-producing pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3989-95.