



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

ACROMEGALIA Y HUELLA METABÓLICA

TESIS DOCTORAL

Betina Biagetti

2020

Depósito 12/2019

Director/Tutor: Prof. Rafael Simó Canonge

Programa de doctorat en Medicina, Departament de Medicina.

Universitat Autònoma de Barcelona

Hospital Vall d'Hebron

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Jordi Mesa, por mirarme sin prejuicios, por confiar en mí, por contar conmigo para proyectos ilusionantes, por potenciarme en la patología hipofisaria, por darme buenos consejos y acompañarme siempre. Muchas gracias.
- Al Profesor Rafael Simó, por compartir sin filtros conmigo su genialidad, por desvelarme nuevos horizontes, por su inagotable energía, por su inspirador punto de vista de cada resultado, por facilitarme y allanarme el camino, por guiarme y siempre enseñarme. Muchas gracias.
- A los pacientes y a los controles sanos, sin su participación este trabajo no habría sido posible.
- A Nati Lopez Martin, Maria José Arnau y Esther García, enfermeras de nuestro Servicio que colaboraron con la firma de consentimientos, extracción de sangre y medidas antropométricas de los participantes.
- A Roser Ferrer, del Servicio de Bioquímica de nuestro Hospital, por facilitarme siempre la interacción, por participar de forma activa en la recolección mantenimiento y custodia de las muestras.
- A Lorena Ramos y Merche Ferrer por siempre facilitarme todos los temas administrativos con una sonrisa.
- A mis compañeros, por compartir mis penas y alegrías durante este proyecto y cada día.
- A mis profesores y compañeros de camino previo por ayudar a forjar quien soy hoy.
- A todas las personas que me han ayudado, con la organización de mi hogar y de mi familia.
- A mis padres, porque me educaron en el valor al esfuerzo, la perseverancia y la superación.

/

A Gabriel: mi cómplice y todo

A mis cuatro tesoros:

Felipe, Victoria, Sofía y Bruno

Si caminas sólo, irás más rápido. Si caminas acompañado llegarás más lejos.

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica,
La voluntad. (Albert Einstein)*

ABREVIATURAS

AA: aminoácidos
AAA: aminoácidos aromáticos
ACRO: acromegalia
ACRO_A: acromegalia activa
ACRO_CO: acromegalia bien controlada con tratamiento médico
ACRO_RE: acromegalia en remisión
AGL: ácidos grasos libres
AASS: análogos de somatostatina
AMHC: alteraciones del metabolismo hidrocarbonado
APO A1: apolipoproteína 1
APO B; apolipoproteína B
BCAAs: aminoácidos de cadena ramificada
BNP: péptido natriurético cerebral o tipo B
CA: análisis de agrupamiento
DEC: dominio extra-celular
DIC: dominio intra-celular
Fig: figura
G6P: glucosa 6 fosfato
GH: hormona de crecimiento
GHBP: proteína transportadora de GH
GHD: deficiencia de hormona de crecimiento
GHR: receptor de GH
GIMC: grosor de la íntima media carotídea
GT: grosor de tabique
GV: grasa visceral
HGP: producción de glucosa hepática
HOMA-IR: valoración del modelo homeostático de resistencia a la insulina
HSC: hiperplasia suprarrenal congénita
HSL: lipasa sensible a hormona
IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina
IGF1-R: receptor de IGF-1
IR: resistencia a la insulina
IRS: sustratos del receptor de la insulina
IS-R: receptor de inulina
JAK: quinasas Janus
LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a masas de espectrometría
PCA: análisis de componentes principales
PCR: proteína C reactiva
PLS-DA: análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
RMN: resonancia magnética nuclear
RTK: receptores tirosina quinasa
TDE: tiempo de desaceleración de la onda E

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
I. RESUMEN	4
II. INTRODUCCIÓN	6
1. Acromegalia	7
1.1. Antecedentes	7
1.2. Síntesis y regulación	7
1.2.2. El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1).....	9
1.3. Receptores de GH, IGF-1 e insulina y solapamiento funcional	11
1.3.1. Receptor de Hormona de crecimiento.....	11
1.3.2. Receptor de IGF-1 y receptor de Insulina	13
1.4. GH, IGF, insulina y metabolismo en general.....	16
1.4.1. GH, IGF-1 , insulina y metabolismo de la glucosa	19
1.4.2. GH, IGF-1, insulina y metabolismo muscular y proteico	21
1.4.3. GH, IGF-1, insulina y metabolismo lipídico.....	23
1.5. GH, IGF-1 , insulina y acciones cardiovasculares	25
1.6. Alteraciones metabólicas en la acromegalia	26
1.7. Miopatía y Acromegalia.....	26
1.8. Alteraciones cardiovasculares en la acromegalia	27
2. Metabolómica.....	29
2.1. Definición.....	29
2.2. Tipo de estrategias.....	29
2.2.1. Estudio dirigido:.....	29
2.2.2. Estudio no dirigido.....	29
2.3. Aspectos metodológicos y tecnológicos en metabolómica:	30
2.3.1. Tipo de plataformas	30
2.4. Análisis bioinformaticos	32
2.5. Aplicaciones de la metabolómica en el campo de la Endocrinología	32
2.5.1. Aplicaciones en pediatría	33
2.5.2. Aplicaciones en adulto	33
2.5.3. Aplicaciones en Acromegalia	34
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
III. MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Diseño:	38
2. Ámbito:.....	38

3.	Población de estudio:.....	38
3.2.	Criterios de inclusión:	39
3.3.	Criterios de exclusión:	39
4.	Medida de la muestra	40
IV.	PROCEDIMIENTO	41
1.	Anamnesis:	42
2.	Evaluación Cardiovascular.....	42
3.	Parámetros séricos y hormonales:	42
4.	Definición de variables:.....	43
5.	Estudio metabólico:.....	43
6.	Recogida de datos:.....	44
7.	Protección de datos personales.....	44
8.	Análisis estadístico	44
IV.	RESULTADOS	46
1.	Análisis descriptivo	47
2.	Análisis comparativo.....	52
3.	Análisis inferencial.....	53
VI.	DISCUSIÓN.....	55
1.	Acromegalia y riesgo cardiovascular	56
2.	Descenso de BCAAs en la acromegalia: implicaciones clínicas	60
VII.	CONCLUSIONES.....	64
VIII.	LÍNEAS DE FUTURO	66
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	68

I. RESUMEN

I. RESUMEN

Abstract:

IGF1 and GH serum levels are the main targets for monitoring acromegaly activity and the successful of treatment. However, there is not a close relationship between IGF and GH circulating levels and clinical course of the disease and the associated comorbidities. The present doctoral thesis was aimed at identifying metabolites that could be used as biomarkers for a better disease phenotyping. For this purpose, metabolic fingerprint using untargeted metabolomic approach was examined in serum from 30 patients with acromegaly and 30 age-matched controls. Patients with acromegaly presented less branched chain amino-acids (BCAAs) compared to the control group (valine: 4.75 ± 0.87 vs. 5.20 ± 1.06 , $p < 0.05$; isoleucine: 2.54 ± 0.41 vs. 2.80 ± 0.51 AUs; $p < 0.05$). BCAAs were also lower in patients with active disease compared to patients with normal levels of IGF-1 with or without medical treatment. In addition, an inverse relationship was found between BCAAs and the deposit of epicardic fat assessed by echography. GH, but not IGF-1 serum levels were inversely correlated with both valine and isoleucine. These findings indicate that low levels of BCAAs is the main metabolic fingerprint of acromegaly and that GH rather than IGF-1 might be the primary mediator. In addition, our results suggest that the assessment of BCAAs could help to identify active disease or residual comorbidities and to monitor the response to therapeutic strategies.

Resumen:

En la acromegalia los niveles de GH e IGF1 son nuestra principal herramienta para monitorizar el curso de la enfermedad y el éxito terapéutico. Sin embargo, estos no siempre reflejan el curso clínico de la enfermedad o las comorbilidades asociadas. La presente tesis doctoral tuvo como objetivo identificar metabolitos que podrían usarse como biomarcadores para un mejor fenotipado de la enfermedad. Para este propósito, se examinó mediante un estudio metabolómico no dirigido la huella metabólica en el suero de 30 pacientes con acromegalia y 30 controles pareados de la misma edad. Los pacientes con acromegalia presentaron menos aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) en comparación con el grupo control (valina: 4.75 ± 0.87 vs. 5.20 ± 1.06 , $p < 0.05$; isoleucina: 2.54 ± 0.41 vs. 2.80 ± 0.51 UAs; $p < 0.05$). Los BCAAs también fueron más bajos en pacientes con enfermedad activa en comparación con pacientes con niveles normales de IGF-1 con o sin tratamiento médico. También detectamos una relación inversa entre los BCAAs y el depósito de grasa epicárdica. Los niveles séricos de GH, pero no IGF-1, se correlacionaron inversamente con la valina y la isoleucina. Estos hallazgos indican que los bajos niveles de BCAAs son la principal huella metabólica de la acromegalia y que GH en lugar de IGF-1 podría ser el mediador principal. Además, nuestros resultados sugieren que la evaluación de los BCAAs podría ayudar a identificar enfermedad activa o comorbilidades residuales y monitorizar la respuesta terapéutica.

II. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Acromegalia

1.1. Antecedentes

La acromegalia (ACRO) es una enfermedad rara, crónica, multisistémica y debilitante con una incidencia aproximada de 4 casos por millón de habitantes y año y una prevalencia de 60 por millón^{1,2}. Su nombre proviene de las raíces griegas ἄκρος (akros = extremo) y μεγάλη (megalo = grande). Las cuales crean el neologismo “acromegalia” que describe de forma concisa la principal característica clínica de esta enfermedad, el desarrollo exagerado de las partes acras o extremos. Cuando esta enfermedad se desencadena en la infancia (antes del cierre de las epífisis), conlleva gigantismo.

La enfermedad se produce en más del 98% de los casos por un adenoma hipofisario benigno que secreta hormona del crecimiento (GH). Esta hipersecreción crónica y no suprimible de GH conduce a una sobreproducción del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) predominantemente en el hígado y como consecuencia, se produce crecimiento y/o aumento de partes acras y órganos internos, cambios metabólicos y varias comorbilidades. La mejora de la terapia médica y quirúrgica ha disminuido la mortalidad en esta población que se está aproximando bastante a la de la población general en los pacientes con acromegalia bien controlada, pero aún continúa siendo alta, principalmente debido a cáncer, enfermedad cardiovascular y patología respiratoria asociada³⁻⁷

Hasta ahora, los esfuerzos terapéuticos se han centrado en la normalización de IGF-1 y GH, porque la duración de la enfermedad y el nivel de GH en sangre han demostrado ser factores predictivos independientes de la incidencia de comorbilidades^{8,9} y de mortalidad general¹⁰⁻¹². Sin embargo, no todas las acciones de GH son dependientes de IGF-I, los efectos directos de GH se han demostrado en muchos tejidos, por ejemplo, en miocitos^{13,14}. Además, la calidad de vida de los pacientes no siempre se correlacionan con los niveles de GH e IGF-1¹⁵ los cuales, podrían modular otros metabolitos y ser éstos los últimos responsables de los diferentes fenotipos, y comorbilidades asociadas.

Así pues, en la acromegalia la afectación fundamental reside en el eje GH/IGF-1, pero la determinación de los niveles circulantes de GH e IGF-1 no son suficientes para explicar en su totalidad el espectro evolutivo de esta enfermedad ni se correlacionan con la calidad de vida de los mismos.

1.2. Síntesis y regulación

1.2.1. La hormona de crecimiento

El gen de la hormona de crecimiento pertenece a una familia de genes que incluye los genes de la prolactina y algunos lactógenos placentarios, y se expresa principalmente en las células somatotropas de la hipófisis anterior¹⁶. La GH es una hormona polipeptídica formada por 191-

aminoácidos de 22kDa, cuya secreción se produce de forma pulsátil (cada 3-4 horas), principalmente por la noche.

La síntesis de GH está controlada por factores hipotalámicos que son la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) que la estimula y la somatostatina que es su principal estímulo inhibitorio. A nivel extra-hipotalámico, es también la somatostatina, secretada en este caso por las células delta del páncreas, el principal inhibidor y también la inhiben, la glucosa¹⁷, los ácidos grasos libres y la retroalimentación negativa de IGF-1^{18,19} (**Fig. 1**). Por el contrario estimulan la secreción de GH la ghrelina, secretada en el estómago²⁰ la hipoglucemia²¹ y los aminoácidos²².

En la circulación, la GH se une a la proteína de unión de la hormona de crecimiento (GHBP) que es una forma trunca soluble del dominio extracelular del receptor de GH (GHR). Por lo tanto, en la circulación existe GH unida y libre (en general en torno al 20%) y el predominio de cada forma depende del patrón pulsátil de su secreción.

Si bien la GH es de las hormonas más importantes en el crecimiento tisular postnatal, también es conocido su papel en el metabolismo en general. Los primeros informes sobre los efectos metabólicos de la hormona de crecimiento son de 1948 y sugieren que la GH induce el metabolismo de los ácidos grasos, promueve resistencia a la insulina (IR) e inhibe la proteólisis durante el ayuno²³. Asimismo la composición corporal²⁴, el envejecimiento²⁵, el sistema cardiovascular²⁶ y las neoplasias^{27,28} se han relacionado con acciones directa o indirectas de GH-IGF-1.

Figura 1 Control de la secreción de GH

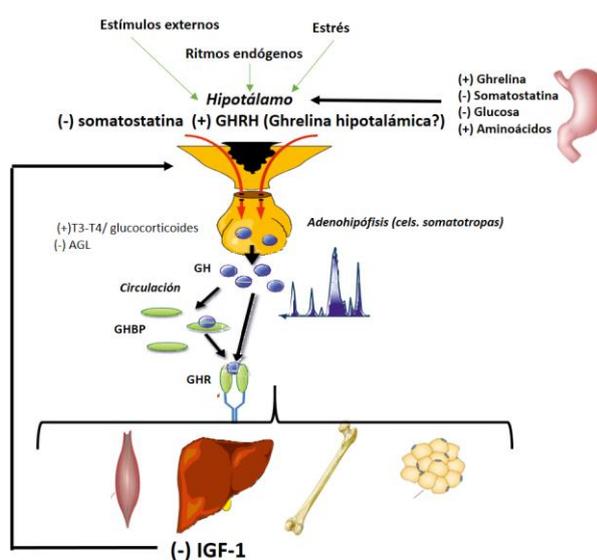


Figura 1. Principales estímulos que promueven o inhiben la secreción de GH.

1.2.2. El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1)

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) pertenecen a una familia de factores de crecimiento que comparten cierta homología estructural con la forma precursora de insulina (pro-insulina)²⁹. En las últimas décadas, ha avanzado nuestro conocimiento sobre los IGF gracias al descubrimiento de dos factores de crecimiento (IGF-I e IGF-II), siete proteínas de unión a IGF (IGFBP-1 a 7) y 9 proteínas relacionadas con IGFBP (IGFBP-RP).

IGF-1 circula principalmente como complejo ternario junto con la proteína de unión a IGF-3 o -5 (IGFBP-3 o -5) y la subunidad ácido-lábil (ALS) (**Fig. 2**), mientras que puede existir en un complejo binario con las otras IGFBP (IGFBP-1, -2, -4, -6). Estos complejos binarios y ternarios modulan la biodisponibilidad de la IGF-1 circulante. Sin embargo, una pequeña fracción (menos del 5%) de IGF-1 circulante también puede existir en forma libre. En un principio la hipótesis de la somatomedina formulada a principios de los años 70³⁰, estableció que la GH promovía el crecimiento somático indirectamente a través de la producción de somatomedina-C (IGF-1) ya que se creía que el hígado era la única fuente de IGF-1. Sin embargo, los datos actuales demuestran que existen otras fuentes de IGF-1³¹. De hecho, la síntesis de IGF-1 por tejidos extrahepáticos puede alcanzar hasta un 25-30% y se ha demostrado que IGF-1 ejerce una acción autocrina /paracrina local que es independiente de GH. Del mismo modo, tal como ya se ha mencionado, GH también tiene efectos mediados por IGF-1 (**Fig. 2**). Es importante recordar que la secreción hepática de IGF-1 requiere un buen estado nutricional y niveles elevados de insulina en vena porta para poder ejercer su acción³². Finalmente, IGF-1 regula negativamente la secreción de GH a través de mecanismos de retroalimentación. Por lo tanto, las alteraciones de los niveles de IGF-1 en general se acompañan de niveles alterados de GH y viceversa. Además de sus efectos sobre el crecimiento y el desarrollo no sólo postnatal sino también intrauterino³³, IGF-1 también tiene efectos en el metabolismo que son similares a la insulina^{34,35} y actúa como un potente inhibidor de la apoptosis celular.

El eje GH-IGF-1 es por tanto un sistema en el cual, aunque GH e IGF-1 se modulan mutuamente, ambas tienen acciones independientes de la otra, y representan un sistema clave en la regulación del crecimiento, supervivencia y metabolismo celular.

La insulina, uno de los reguladores clave del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, es una hormona peptídica sintetizada por las células β de los islotes pancreáticos. La insulina se almacena en vesículas secretoras y es liberada en el torrente sanguíneo en respuesta al aumento de la glucosa³⁶. En su forma activa consta de dos cadenas polipeptídicas: la A, de 20 aminoácidos y la B, de 31. Estas dos cadenas se unen entre sí por medio de dos puentes disulfuro. Se sintetiza como preproinsulina molécula formada por una sola cadena polipeptídica, que posteriormente y en diversas

partes de la célula, sufre varios procesamientos para obtener finalmente la insulina activa. La secreción de insulina es también regulada por varios factores, como el péptido similar al glucagón (GLP-1) y los ácidos grasos libres (AGL). En la circulación, la insulina circula en forma libre (sin unión a proteínas), estabiliza los niveles de glucosa en sangre estimulando la captación de glucosa por varios tejidos y suprimiendo la producción de glucosa hepática (HGP). Además, de regular el metabolismo de lípidos y proteínas, promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos constatándose de esta forma los efectos solapados de este grupo hormonal.

Así pues, el eje GH-IGF-1 es un sistema clave, al regular el crecimiento, la supervivencia de las células y tener un papel relevante en el metabolismo, pero sus funciones se solapan en algunos aspectos con las funciones ejercidas por la insulina.

1.3.Receptores de GH, IGF-1 e insulina y solapamiento funcional

1.3.1. Receptor de Hormona de crecimiento

El receptor de hormona de crecimiento (GHR) pertenece a la denominada "superfamilia de receptores de citoquinas". Estos receptores tienen la particularidad de no presentar actividad tirosinquinasa "per se" y, por tanto, requieren de la activación de kinasas intracelulares.

El GHR está ampliamente distribuido en todo el organismo, aunque su expresión es particularmente importante en el hígado, también hay receptores de GH en muchos otros tejidos incluyendo músculo, grasa, corazón, riñón, cerebro y páncreas³⁷. Las acciones de GH dependerán no sólo del receptor sino también del órgano específico al que estimule (**Fig. 2**).

Figura 2 Acción de GH en los diferentes órganos diana

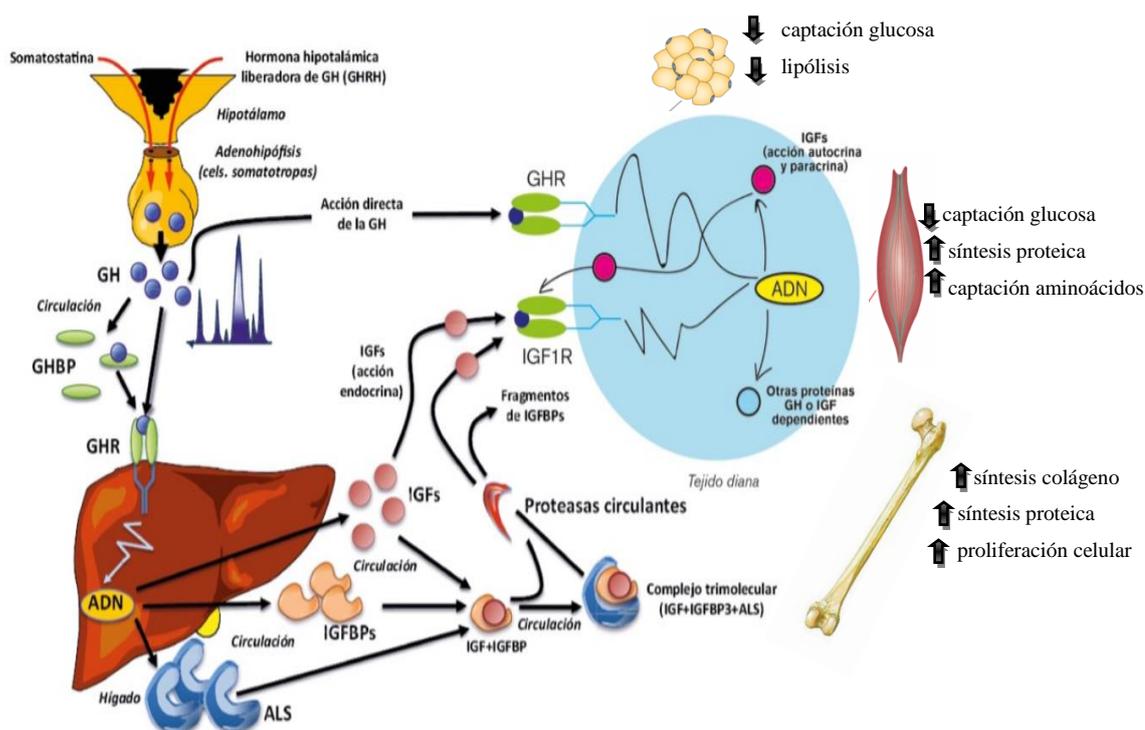


Figura 2: Acción de GH directa e indirecta a través de IGF-1 sobre órganos diana y producción local por los órganos diana de IGF-1 con acciones auto y paracrina

La molécula de GHR está constituida por 638 aminoácidos. En su estructura se pueden diferenciar tres dominios: un dominio intracelular (DIC) de 350 aminoácidos, una porción transmembrana (DT) y un dominio extracelular (DEC) de 246 aminoácidos de unión a la hormona de crecimiento. Este último puede solubilizarse constituyendo GHBP circulante en el plasma que regula la disponibilidad de GH³⁸.

La dimerización inducida por la unión de GH a los receptores (**Fig. 3**) es el paso clave en la activación de la vía de señalización JAK /STAT (tirosin quinasa intra celulares Janus / Activadores de las Señales de Transcripción), la unión a GHR aproxima dos moléculas de JAK2 de manera suficiente para que se inicie la transfosforilación de las mismas reclutando STAT^{39,40}. Además de su función en la transducción de señal, las moléculas JAK2 potenciarían la estabilidad de la forma madura del GHR y tendrían un papel regulatorio en la proteólisis del DEC del receptor, es decir de GHBP^{41,42}. Las STATs fosforiladas por JAK2, dimerizan y se traslocan al núcleo, uniéndose a secuencias específicas del ADN e inducen la transcripción de genes GH-dependientes específicos, promoviendo entre otros, la síntesis de IGF-1, (IGFBP-3) (ALS), favoreciendo la vida media del IGF-I en circulación por la formación del complejo ternario IGF-I/IGFBP-3/ALS⁴³. La regulación negativa del mecanismo de transducción de señal inducido por la GH está a cargo de unas moléculas codificadas por genes citoquina-inducibles, denominadas “supresoras de señal de transducción de receptores de citoquinas” o “SOCS”⁴⁴..

Figura 3: Mecanismo de activación del receptor de GH

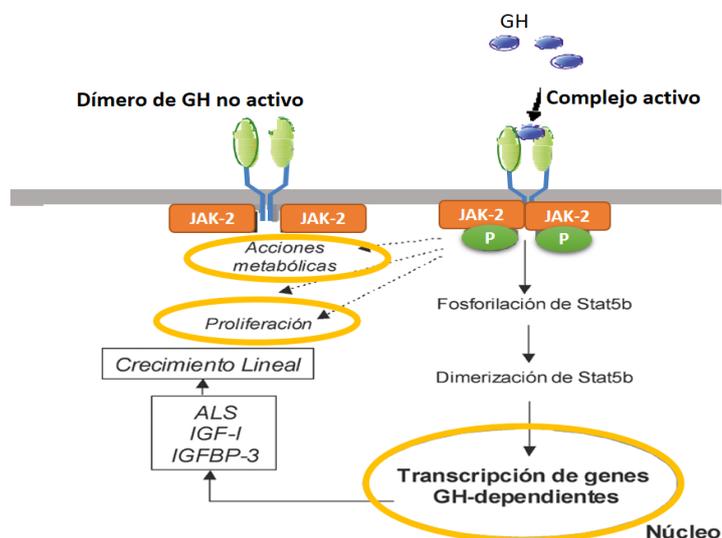


Figura 3: GHR (receptor de GH) Modelo de mecanismo de activación del GHR. La unión de GH a GHR dimeriza el receptor y genera un cambio conformacional que aproxima dos moléculas de JAK-2 promoviendo las acciones metabólicas y de proliferación celular y también la fosforilación de STAT que se trasloca al núcleo estimulando la transcripción de factores GH dependientes (IGF-1, IGF-1BP3, ALS)

1.3.2. Receptor de IGF-1 y receptor de Insulina

A diferencia de GHR, el receptor de insulina (IS-R) y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGFI-R) son miembros de la familia de receptores tirosina quinasa (RTK). La característica común de este tipo de receptor es tener un dominio extracelular para la unión del ligando, un solo dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina-quinasa, que se activa tras la unión del ligando al dominio extracelular desencadenando la fosforilación de los sustratos endógenos de insulina (IRS, de Insulin Receptor Substrates), los IRS son ubiquitarios habiendo 4 tipos y siendo los más comunes el 1 y el 2. Una vez el IRS es fosforilado, activa diferentes vías tales como PI3K o RAS (**Fig. 4**).

Los receptores IS-R/ IGF1-R al igual que sus ligandos, están codificados por distintos loci genéticos que se cree que han evolucionado desde un gen ancestral común por lo que comparten una elevada homología. A diferencia de otros RTK, que se activan por dimerización inducida por ligando, IS-R e IGF-1-R existen en la superficie celular como tetrámeros, con 2 subunidades alfa y 2 beta⁴⁵. Estos receptores pueden unirse tanto a la insulina como a los IGF, pero cada receptor tiene más afinidad por su propio ligando. Asimismo, existen receptores híbridos, constituidos por heterodímeros IS-R / IGF-1R, con efectos biológicos cercanos a los del IGF-1R⁴⁶, es decir promotor de división celular. Estos híbridos parecen jugar un papel importante en la señalización de IGF-1 en líneas tumorales. Como se muestra en la figura 4, estos receptores tienen cierto solapamiento funcional pero a modo de resumen podemos decir que la insulina y en menor grado IGF-1 a través de IS-R regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas vía PI-3K/akt, mientras que IGF y en menor grado insulina a través de IGF-1-R activa la vía RAS/MAP kinasa que está más relacionada con el crecimiento celular, la síntesis proteica, y la apoptosis⁴⁷.

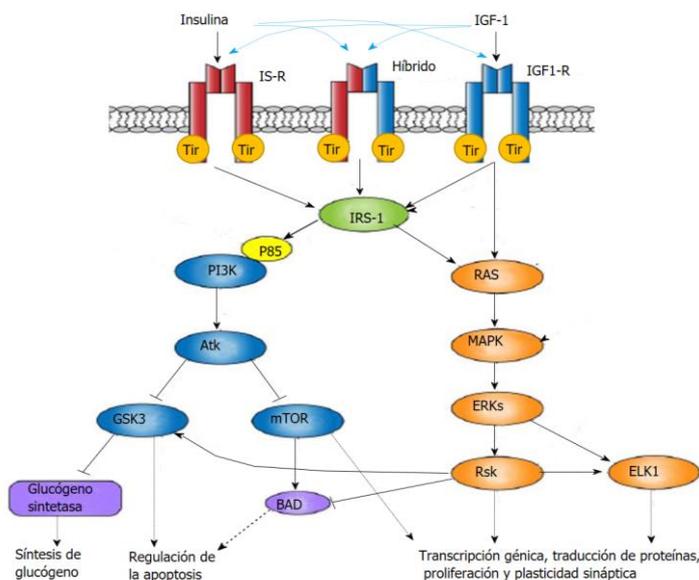
Figura 4 Receptores y solapamiento funcional entre IS-R, IGF1-R e híbrido-R

Figura 4 El receptor de insulina (IS-R) el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1-R) y el receptor híbrido pertenecen a la familia de receptores tirosina quinasa. Tras la unión de los ligandos al receptor, este experimenta un cambio conformacional, que activa la tirosina quinasa, lo que lleva a la autofosforilación de la tirosina, que desencadena la fosforilación de IRS y activa los diferentes efectos con cierto solapamiento funcional remarcando el papel metabólico de insulina, de crecimiento de IGF-1 y tumorogénico de los receptores híbridos.

Este solapamiento funcional se demuestra en experimentos con ratones *knockout*. Los ratones que carecen de IR nacen con un ligero retraso de crecimiento (10% aproximadamente) y sin alteraciones en el desarrollo embrionario y después del nacimiento, mueren a los pocos días por cetoacidosis diabética^{48,49} Este experimento indica que IR es necesario para el metabolismo postnatal, pero no para el metabolismo embrionario. Los ratones *KO* para el gen de IGF-1-R, por otro lado, presentan un desarrollo intrauterino severamente retardado (45% de lo normal) y mueren a los pocos minutos del nacimiento, probablemente como resultado de fallo respiratorio causado por falta de desarrollo del diafragma y los músculos intercostales. Además, nacen con múltiples anomalías (i.e. hipoplasia muscular, retraso de la osificación y epidermis delgada⁵⁰) y también desarrollan anomalías metabólicas como hiperglucemia leve (250 mg / dL) y disminución del número de células beta pancreáticas.

El receptor de IGF-I se expresa en varios tejidos del organismo. Sin embargo, el número de receptores en cada célula está estrictamente regulado por varios factores sistémicos y tisulares que incluyen GH circulante, tiroxina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos. Sin lugar a dudas, los factores extrínsecos contribuyen a las diferencias

entre señalización IR e IGF-1-R, pero es poco probable que sean los únicos factores (**Fig. 5**). Por ejemplo, los tejidos sensibles a la insulina tienden a expresar mayor número de IR que IGF-1-R, así el hígado y el tejido adiposo poseen pocos IGF-1-R, mientras que el músculo tiene cantidades considerables. Sin embargo, a pesar de que el hígado está prácticamente desprovisto de IGF-1-R, mantiene su capacidad mitogénica vía IR^{47,51} Por lo tanto, el número de receptores por sí solo no es el único factor determinante en la función.

Figura 5 Especificidad de la señalización IR IGF1R

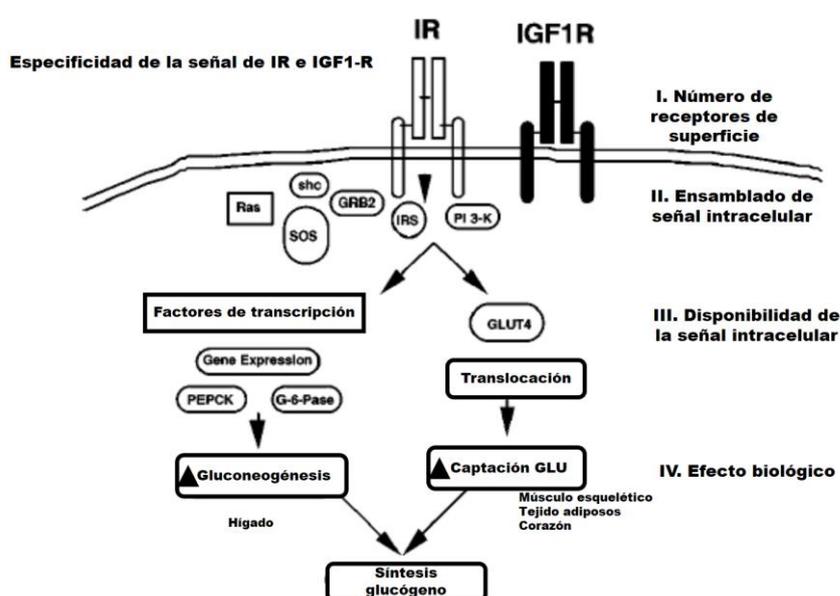


Figura 5. Elementos que confieren especificidad de señalización. Visión simplificada de cómo los diferentes receptores pueden engendrar diferentes acciones biológicas. Podemos distinguir cuatro pasos que conducen a una respuesta fisiológica. Primero es el número y la distribución de receptores en la superficie celular, la biodisponibilidad de los respectivos ligando (s) y la cinética de la interacción. El segundo nivel de la especificidad está determinada por la abundancia y la distribución subcelular de sustratos de señalización y mediante el compromiso de distintas vías de señalización. El tercer nivel de especificidad lo confiere la presencia intracelular de la maquinaria adecuada. Por ejemplo, el transporte de glucosa dependiente de insulina requiere la presencia de GLUT4. Por lo tanto, a pesar de que tanto el hígado y el músculo poseen los componentes de señalización intracelular para responder a insulina, solo músculo y tejido adiposo poseen la maquinaria intracelular requerida para llevar a cabo la absorción de glucosa dependiente de insulina. Un nivel final de especificidad se logra a través de una combinación de respuestas heterogéneas. Por ejemplo, insulina estimula la síntesis de glucógeno en hígado y músculo por mecanismos diferentes. Adaptado de Kim and Accili *Growth Horm. IGF Res.*2002⁴⁷

1.4.GH, IGF, insulina y metabolismo en general

En términos de biología evolutiva, los efectos de GH en el metabolismo de los humanos es simple. En condiciones de exceso de alimentos, GH, IGF-I e insulina, promueven la retención de nitrógeno y la formación de proteínas (anabolismo). En cambio, cuando la comida es escasa, GH evita el consumo de carbohidratos y proteínas a nivel celular y promueve el empleo de lípidos como combustible (lipólisis), lo que permite la conservación de las reservas de proteínas vitales (aminoácidos esenciales entre otros). Sin duda, este cambio en la utilización de sustrato metabólico de carbohidratos a lípidos ha jugado un papel importante para la supervivencia y prevalece siempre que la escasez de nutrientes amenaza^{52,53}. Además de la conservación de glucosa y proteínas mediadas por lípidos, la GH preserva proteínas de forma directa e indirecta vía IGF-I e insulina.

El rol metabólico central de la GH surge de las hipótesis de los años sesenta del pasado siglo⁵³

- 1) La hipótesis del "genotipo ahorrativo"⁵⁴, según el cual la evolución ha favorecido la supervivencia de las personas genéticamente con un buen apetito y capacidad de almacenar excedentes de calorías en forma de grasa.
- 2) El ciclo de Randle⁵⁵ según el cual los ácidos grasos libres (AGL) compiten con la glucosa y evitan su captación en diversos tejidos, lo cual favorece conduce a un estado de IR. Como la liberación sostenida de glucosa es dependiente de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos, el aumento en la utilización de la grasa y la disminución de la utilización de glucosa en última instancia también disminuyen la proteólisis.
- 3) El "ciclo del ayuno y la comida"⁵⁶ según el cual la insulina es la principal hormona anabólica que almacena todos los combustibles durante la comida y GH es la principal hormona anabólica durante el ayuno y el estrés, ahorrando glucosa y proteínas a expensas de promover la utilización de los lípidos.

En la **Figura 6** se indica como en períodos de acceso fácil a alimentos, los individuos predispuestos ganan peso. Por un lado, la obesidad resultante hace al individuo susceptible a la IR, diabetes y enfermedad cardiovascular, asimismo, los depósitos de grasa posibilitan aumentar los niveles de AGL y protegen al individuo durante la hambruna. A diferencia de la morbilidad cardiovascular, que en general afecta a personas de mayor edad, el hambre plantea una mayor amenaza a la supervivencia humana porque amenaza a todos los grupos de edad y además merma la reproducción por lo que la tendencia "ahorrativa" puede ser vista como un mecanismo de defensa biológica. Los periodos de ayuno y post-ingesta (**Fig.7**) están regulado por la insulina como hormona principal en los períodos de ingesta acumulando glucógeno y grasa, y la GH acumulando proteína y

promoviendo la utilización de grasa como principal sustrato en vez de la glucosa en los períodos de ayuno.

Gracias a los experimentos de Houssay (Premio Nobel de Medicina en 1947) sabemos que la GH está relacionada con la regulación del metabolismo intermediario^{57,58}. En estos estudios se demostró que los perros hipofisectomizados eran hipersensibles a las acciones de la insulina y propensos a la hipoglucemia. Luego, cuando los extractos de GH humana estuvieron disponibles, se demostró que la inyección de estos extractos en sujetos sanos y en pacientes con GHD estimulaba la lipólisis y promovía hiperglucemia⁵⁹⁻⁶¹. Asimismo estudios clásicos en los que se perfundía GH localmente a través de la arteria braquial demostraron que la GH inhibía de forma aguda la captación de glucosa a nivel muscular en individuos sanos durante el ayuno^{62,63}

Figura 6 Esquema de los ciclos "genotipo ahorrador"

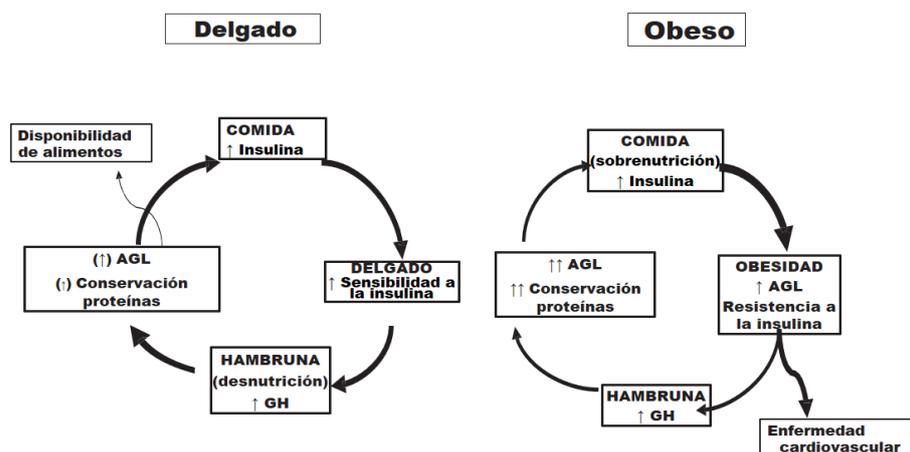


Figura 6 Esquema de los ciclos "genotipo ahorrador", "ciclo de la glucosa-ácido grasos" y "ciclo del ayuno y la comida" Adaptado de Moller End Rev 2009⁵³

Es importante destacar que la GH tiene efectos metabólicos agudos y crónicos. Dentro de las acciones agudas se incluye la estimulación de la lipólisis que aumenta los niveles de AGL en la sangre, la disminución de la captación muscular de glucosa y la síntesis proteica^{62,64}. La exposición crónica a GH, como por ejemplo en los pulsos de GH repetitivos o en la acromegalia, en presencia de nutrición correcta y niveles suficientes de insulina portal, induce producción hepática de IGF-I³² y supresión de la proteína de unión a IGF-1 (IGFBP) aumentando la IGF-I libre. De forma más tardía aumentan las reservas de proteínas, hay crecimiento de órganos y partes blandas y la masa grasa corporal disminuye.

Figura 7 Ciclo del ayuno y la comida

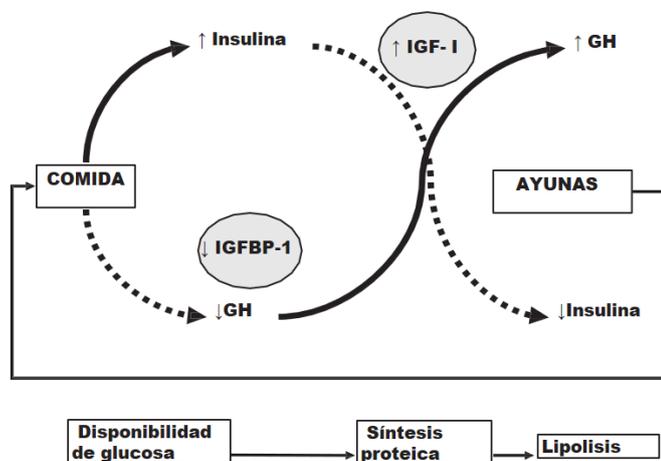


Figura 7 Ciclo del ayuno y la comida incluyendo variaciones en la secreción y acción de insulina y GH y el consiguiente cambio en IGFBP-1 e IGF-I. En el período post-prandial inmediato, la insulina es la que actúa para promover el almacenamiento de glucosa. En la post-absorción tardía o el ayuno, GH actúa para promover la lipólisis. En la fase intermedia, insulina y GH actúan en sinergia para promover la producción y bioactividad de IGF-I con la subsiguiente síntesis de proteínas

El orden y la secuencia temporal de eventos es importante. GH estimula la lipólisis y causa IR en 1-2 h, y estos efectos desaparecen en aproximadamente 8 h⁶⁵. Los efectos GH a través de e IGF-1 son más tardíos y sostenidos y tal como ya se ha comentado, requiere de un balance energético positivo y niveles adecuados de insulina.

1.4.1. GH, IGF-1 , insulina y metabolismo de la glucosa

En humanos, dosis fisiológicas de GH humana no causan aumento de la glucemia en sujetos sanos sin alteraciones del metabolismo hidrocarbonado (AMHC), pero disminuyen la sensibilidad a la insulina inyectada⁶⁶ Para facilitar la comprensión de este apartado se propone previamente revisar las interacciones metabólicas entre la glucosa, los lípidos y las proteínas que se resumen de forma esquemática en la **Figura 8**.

Figura 8 Metabolismo de proteínas glucosa y lípidos y sus interrelaciones

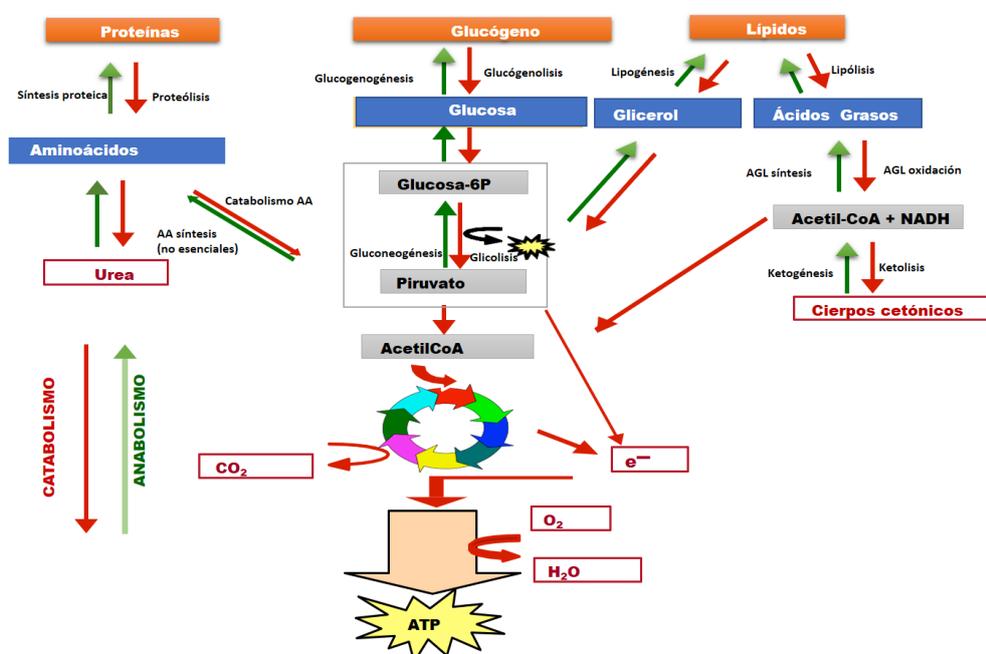


Figura 8 Resumen esquemático de la interacción entre el metabolismo de proteínas glucosa y lípidos y sus interrelaciones. Los aminoácidos pueden ser una fuente de glucosa (vía gluconeogénesis) La glucosa se fosforila a glucosa 6P (G6P) para poder almacenarse como glucógeno (glucógeno-génesis). La glucosa puede transformarse en acúmulo de grasa. En la lipólisis la lipasa escinde los ácidos grasos del glicerol y éste puede ser convertido en glucosa por la vía de gluconeogénesis.

Una dosis fisiológica de GH (100 µg/h) infundida durante 4h en ayunas a sujetos sanos, desencadena un descenso abrupto en la captación de glucosa del 40% en los músculos del antebrazo, junto con una disminución más lenta de hasta el 50% en la oxidación de glucosa (glucólisis)⁶⁷. Por lo tanto, el hecho de que la GH disminuye la glucólisis y la captación de glucosa a nivel muscular sin aumentar sus niveles plasmáticos, implica dos circunstancias:

1) La GH ha de promover en nuestro organismo la utilización de la glucosa en compartimentos diferentes al músculo^{52,53} (estos destinos no son la formación de grasa en tejido adiposo o hígado ya que está comprobado lo contrario^{52,68}), promoviendo su metabolismo en la en tubo digestivo, hígado y riñón⁵³.

2) Si la glucosa ya no es tan accesible como sustrato metabólico, la GH podría entonces promover la gluconeogénesis. En apoyo a esto, estudios *in vitro* confirman que existe un aumento de la gluconeogénesis a partir de alanina y lactato en la corteza renal de perros expuestos a GH⁶⁹ (recordemos que el riñón es responsable de la producción del 50% de la glucosa basal en el ayuno). Además, también se ha evidenciado aumento de la gluconeogénesis en pacientes con acromegalia⁷⁰

Así pues, teniendo en cuenta los efectos lipolíticos de la GH, la hipótesis de Randle et al.⁵⁵ es muy atractiva a la hora de explicar cómo GH sería capaz de inhibir la captación de glucosa en tejidos periféricos. Según su hipótesis (el ciclo de glucosa/ácido graso), la oxidación de AGL inicia una inhibición en cadena de enzimas glicolíticas, que finalmente resulta en la inhibición de la captación de glucosa (**Fig. 9**).

Figura 9 El ciclo de la glucosa-ácido graso (hipótesis de Randle)

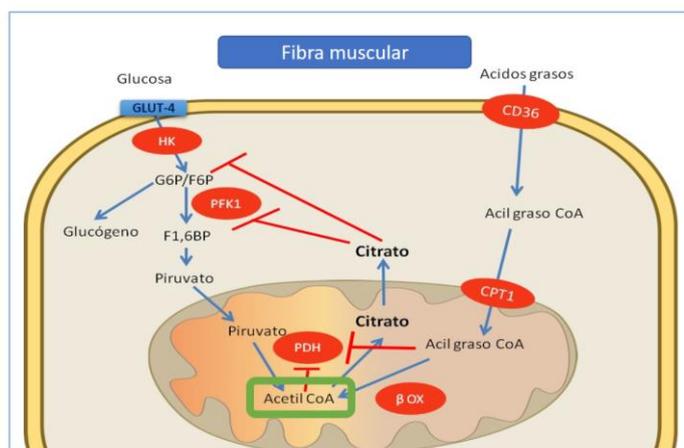


Figura 9 El ciclo de la glucosa-ácido graso en el músculo. La acetil-CoA es una molécula clave para generación de energía (entrada en el ciclo de Krebs) La acetil-CoA puede obtenerse de la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico proveniente de la glucosa o de la beta-oxidación de los ácidos grasos. La oxidación de ácidos grasos inhibe la piruvato deshidrogenasa (PDH), por lo que la utilización de ácidos grasos inhibiría la captación de glucosa. El citrato, que genera el ciclo de Krebs, también inhibe la fosfofructoquinasa (PFK).

En apoyo a esta teoría, se ha demostrado que la co-administración de agentes anti-lipolíticos y GH revierte la IR inducida por GH⁷¹. Además, en adultos con deficiencia de GH (GHD) el tratamiento con GH + acipimox (un derivado del ácido nicotínico que bloquea las acciones de HSL (lipasa sensible a hormona) restauraba la sensibilidad a la insulina⁷².

Por otro lado IGF-I, inhibe la secreción de GH y también antagoniza sus efectos glucogénicos, al aumentar la absorción de AGL en el músculo lo cual mejora indirectamente la acción de la insulina a nivel hepático³⁴. La administración de niveles farmacológicos de IGF-I a sujetos normales puede estimular directamente el transporte de glucosa hacia músculo a través de receptores híbridos insulina/IGF-I⁷³. Además, una alta concentración de IGF-I libre puede suprimir directamente la gluconeogénesis renal en ratones³⁴. En individuos sanos el bloqueo del receptor de GH no produjo cambios en los niveles de IGF-I circulante o tisular y suprimió selectivamente la movilización y oxidación de los lípidos después del ayuno⁷⁴. Esto apoya el concepto de que la estimulación de la lipólisis es un efecto primario e importante de la GH⁷⁴. En pacientes con ACRO el antagonista del receptor de GH (Pegvisomant) al bloquear la acción de GH, mejoraría la sensibilidad a la insulina y reduciría la producción endógena de glucosa durante la noche gracias a la reducción de AGL y a la acción específica de IGF-I⁷⁵.

En definitiva, en relación al metabolismo de la glucosa podemos afirmar que la GH, disminuye la captación de glucosa muscular (condicionando un cambio de fuel a nivel muscular, que pasa del empleo de glucosa al de ácidos grasos), promueve la formación de G6P y la gluconeogénesis hepática y renal. IGF-1 puede modular indirectamente el metabolismo de carbohidratos a través de la supresión de GH y también imitando la acción de la insulina.

1.4.2. GH, IGF-1, insulina y metabolismo muscular y proteico

Teniendo en cuenta que existe un balance nitrogenado que se ha de mantener estable para mantener el pool de aminoácidos (AA) que intervienen en la formación proteica, se han empleado diferentes técnicas de marcaje de AA para evaluar los efectos de GH e IGF-1 en el metabolismo proteico. En la **Tabla 1** se resumen los principales estudios donde, tras la administración de GH, se midió con radioisótopos el efecto en las proteínas. En la **Tabla 1** se aprecia que la acción de GH en el tejido muscular es netamente anabólica y tiene poco efecto en la proteólisis.

Fryburg et al.⁷⁶ infundieron GH en la arteria braquial, que fue acompañada por un aumento local en la síntesis de proteínas musculares del antebrazo (medido por el ratio de desaparición de aminoácidos). El mismo grupo⁷⁷ observó que la infusión de GH intravenosa durante 8 horas en adultos normales producía una estimulación aguda de la síntesis proteica en la musculatura del antebrazo, sin ningún efecto sobre la síntesis de proteínas del resto del organismo. En la misma línea, Copeland y Nair⁷⁸ en un diseño que incluía la administración conjunta de GH y somatostatina para suprimir la secreción insulina, observaron un efecto estimulante agudo de la GH en la síntesis de proteínas en toda la economía que iba asociado a una disminución en los niveles séricos de leucina.

En cuanto a los efectos más prolongados, un estudio que evaluó el impacto de la GH en el metabolismo de las proteínas en ayunas encontró que altas dosis de GH (0.1 mg / kg d) durante 7 días aumentó tanto la síntesis de proteína como la oxidación de leucina en el todo el organismo, sin afectar la proteólisis⁷⁹. Resultados similares se obtuvieron tras la administración de GH en pacientes con GHD⁸⁰, y tras la administración de GH en pacientes en hemodiálisis desnutridos⁸¹. Estos experimentos soportan la acción anabólica de GH medida por el consumo de AA marcados en el torrente circulatorio.

Los efectos de la administración sistémica de IGF-I en el metabolismo proteico parecen depender de los niveles de aminoácidos ambientales, en el sentido de que el IGF-I administrado sin AA suprime la proteólisis⁸², mientras que el IGF-I en combinación con una infusión de aminoácidos aumenta la síntesis de proteínas⁸³.

Tabla: 1 Resumen de los trabajos que estudian la acción de GH en el músculo

Autor	Sujetos	Diseño	Dosis	Músculo local	Proteína organismo	Hormonas
Fryberg⁷⁶	7 sanos	Infusión arteria brazo no placebo	0,014µgr/kg/min en 6h	Rd PHe ↑ BCAAs ↓	NA	GH ↔ IGF-1 ↔ Ins. ↔ Captación glucosa ↔
Fryberg⁸⁴	7 sanos	Infusión braquial 3h GH y luego gh + insulina / no placebo	0,014µgr/kg/min en 6h Insulina 0.02mU/kg/min 3h	3h Rd ↑ 6h Rd ↑ Ra ↔ BCAAs ↓	NA	GH ↔ IGF-1 ↔
Yarasheski⁸⁵	16 sanos	Resistencia a ejercicio GH/placebo	40µgr/d 12 semanas	Grosor muscular Síntesis ↔	Síntesis ↑ Leu. oxidación ↓ Urea ↓	IGF-1 ↑ AUC ins ↑
Fryburt and Barret⁷⁷	8 sanos	Infusión arteria brazo sistémica no placebo	0,06µgr/kg/min en 6h	Rd ↑	Síntesis ↔ proteólisis ↔ Leu. oxidación ↓	IGF-1 ↑ Captación glucosa ↓
Copeland⁷⁸	15 sanos	Infusion, clamp páncreas/control	2µgr/kg/h en 3.5h	Ra ↓	Síntesis ↑ Leu. oxidación ↓	Ins, glucosa ↔ cortisol ↔ IGF-1 ↔
Garibotto⁸⁶	6 Dialisis malnutridos	Prospectivo, cruzado no control	5mg 3 veces sem./6sem.	Rd ↑ BCAAs ↓	Flujo phenil ↔	IGF-1 ↑ IGFBP1 ↓ Glucosa ↔ Insulina ↔
Norrelund⁸⁷	8 sanos tras 40h ayuno	Infusion, clamp páncreas/control	4,5IU en ayunas	Ra ↓ BCAAs ↓	Urea ↓	IGF-1 ↑ Glucosa ↑
Nielsen⁸⁸	7 GHD	GH sc controlado	GH remplazo	Ra ↔ Rd ↔	Urea ↓	IGF-1 ↑ Glucosa ↑

Ins: (insulina) Leu (leucina) BCAAs (aminácidos ramificados) Phe (fenil alanina)

Rd Phe (ratio de desaparición de Phe) representa la síntesis proteica⁸⁹.

Ra Phe (ratio de aparición de Phe) representa la proteólisis⁸⁹

1.4.3. GH, IGF-1, insulina y metabolismo lipídico

Como ya se ha comentado, el efecto más sensible y característico tras la administración de GH es el aumento de AGL y cuerpos cetónicos lo cual confirma que GH promueve el empleo de AGL como sustrato metabólico y genera resistencia insulínica. Esta respuesta acontece tanto en la administración pulsátil como continua de GH^{90,91}. Respecto a la fuente de AGL, estudios con microdiálisis demuestran que el pulso de GH aumenta el glicerol tanto a nivel femoral como abdominal, lo que sugiere que ambas regiones contribuyen^{92,93}. Asimismo el hecho de que la administración crónica de GH reduzca la grasa visceral apoya la participación también a este nivel^{94,95}. Por otro lado se ha postulado que la secreción pulsátil nocturna sería la responsable del incremento matutino de AGL⁹⁶. Esta idea la corroboran estudios que muestran que la falta de liberación nocturna de GH reduce el aumento fisiológico nocturno de AGL⁹⁶⁻⁹⁹. No hay evidencia que la GH afecte de manera aguda las tasas de síntesis de triglicéridos⁹⁵

Los efectos lipolíticos como ya se ha comentado, están mediados al menos en parte, por la HSL¹⁰⁰ (**Fig. 10**).

Figura 10 Efectos de GH en el metabolismo de los AGL

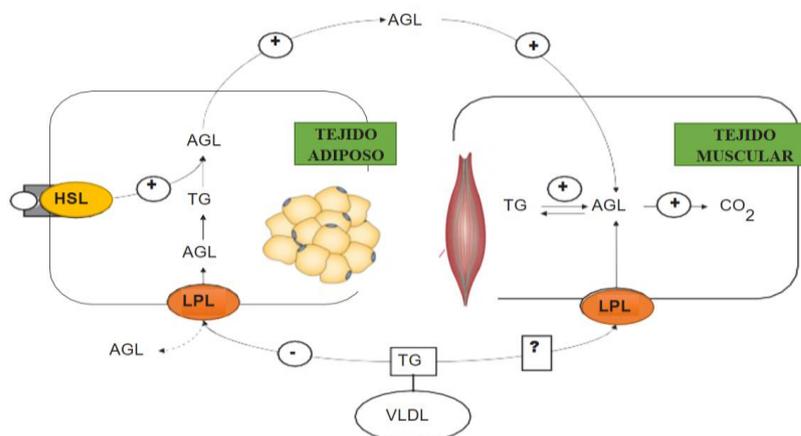


Figure 10: Ilustración esquemática y simplificada de los efectos estudiados de GH en el metabolismo de las grasas en el tejido adiposo y el músculo esquelético. “+” Activación por GH; “-” inhibición por GH. La GH parece no afectar el recambio de triglicéridos (TG) asociado con lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Modificado de Møller and Jørgensen • *Metabolic Effects of GH*⁹⁵

Asimismo, tenemos evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la GH inhibe (posiblemente vía IGF-1) el paso de cortisona a cortisol a través de la inhibición de la actividad de 11beta - hidroxisteroide deshidrogenasa en el tejido adiposo abdominal^{101,102}. La reducción en los niveles de cortisol es otra

forma de disminuir la obesidad abdominal y este efecto podría involucrar una reducción de la actividad LPL, inhibición de la diferenciación pre-adipocitos a adipocitos maduros, y la inducción de un perfil favorable de adipokinas inflamatorias.

Finalmente, en la ACRO activa se ha descrito aumento claro de la lipotoxicidad por acúmulo ectópico de grasa y disfunción del tejido adiposo visceral¹⁰³⁻¹⁰⁶. Esta situación contribuye probablemente a la IR y las principales alteraciones metabólicas que caracterizan la ACRO.

Así pues, evolutivamente, la GH desempeña un papel esencial durante el ayuno, evita el catabolismo de carbohidratos y proteínas y promueve el empleo de lípidos como combustible, lo que permite la conservación de las reservas de proteínas vitales (aminoácidos esenciales entre otros). Sin embargo, en la acromegalia a pesar de ésta lipólisis activa existe “lipotoxicidad” y disfunción del tejido adiposo visceral, lo que podría contribuir a resistencia a la insulina observada en estos pacientes.

1.5.GH, IGF-1, insulina y acciones cardiovasculares

A nivel del miocardio además de estimular el crecimiento, GH/IGF-1 tiene cierto papel en la contractilidad, e interactúa con el sistema vascular regulando el tono vascular y por lo tanto la resistencia periférica, pero también a nivel central modulando el tono simpático¹⁰⁷.

El miocardio y los vasos poseen receptores para GH^{108,109} e IGF-I^{110,111}, y, además, ambos son capaces de sintetizar IGF-I local^{112,113}. Por lo tanto, las acciones de GH e IGF-1 en el sistema cardiovascular son el resultado de acciones directas de GH e IGF-1, así como efectos autocrinos/paracrinos del IGF-1¹⁴.

El efecto de GH e IGF-1 en el sistema vascular es predominantemente vasodilador¹¹⁴⁻¹¹⁷. Varios estudios sugieren que las acciones vasculares de IGF-I son mediadas por liberación de óxido nítrico (ON) y, de hecho el IGF-I estimula la liberación de ON en cultivos de células endoteliales¹¹⁸, células del músculo liso vascular¹¹⁹, así como preparaciones aórticas¹²⁰. Además, IGF-I puede causar vasodilatación a través de acciones no dependientes del endotelio, posiblemente por aumento de la actividad de la bomba Na-K-ATPasa en las células del músculo liso arteriolar¹²¹. Otro posible mecanismo implica la regulación de la expresión génica en el músculo liso vascular del canal KATP¹²², este canal tiene 2 componentes el canal Kir6.1 / SUR2B (receptor de sulfonilurea), siendo la subunidad Kir6.1 responsable crítico del tono muscular^{14,123}.

También se ha sugerido que algunos efectos vasoactivos de GH pueden tener un origen central. Un estudio en pacientes con GHD y controles sanos equiparados por IMC, constató que los pacientes con GHD tenían aumentado notablemente el tono del sistema nervioso simpático¹⁰⁷. Por otra parte, tras un año de sustitución con GH se registró un efecto modesto pero significativo en la reducción de la actividad del nervio simpático y el tono vascular¹²⁴. Esto podría sugerir que la GH puede regular el tono simpático disminuyendo la resistencia periférica.

Por tanto, el miocardio y los vasos poseen receptores para GH e IGF-I y sintetizan IGF-I local. Las acciones de GH e IGF-1 en el sistema cardiovascular son el resultado de acciones directas de GH así como efectos endocrinos o autocrinos/paracrinos del IGF-1. El papel de GH/IGF-1 en el sistema cardiovascular es eminentemente vasodilador vía ON, la bomba Na-K-ATPasa y el sistema nervioso autónomo.

1.6. Alteraciones metabólicas en la acromegalia

Varios estudios han determinado las alteraciones metabólicas en la acromegalia activa antes de iniciar tratamiento^{103,125-127}. Las más características y que se han revisado anteriormente son:

- 1) Aumento de la lipólisis y niveles elevados de AGL (la más característica)
- 2) Alteraciones del metabolismo hidrocarbonado (AMHC): IR: disminución de la captación de glucosa periférica (principalmente muscular) y estimulación de la gluconeogénesis (hepato-renal) y G6P
- 3) Empleo de aminoácidos para el anabolismo proteico.
- 4) Aumento de masa magra y disminución de la masa grasa, depósitos ectópicos y disfunción del tejido graso.

La hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa y la diabetes mellitus son características comunes de la acromegalia activa¹²⁸⁻¹³⁰, y es probable, aunque no existe evidencia clara de que estas anomalías contribuyan al aumento observado en morbilidad y mortalidad¹³¹⁻¹³⁴.

1.7. Miopatía y Acromegalia

La acromegalia genera varias comorbilidades, algunas de las cuales persisten a pesar de normalizar GH e IGF1 incluso en pacientes curados o en remisión¹³⁵. Dentro de estas, la debilidad muscular es una de las menos estudiadas¹³⁶. Sin embargo, es uno de los mayores condicionantes de la mala calidad de vida de estos pacientes^{137,138}. Desde hace mucho tiempo es conocida la presencia de hipertrofia muscular pero con debilidad y mialgias en estos pacientes¹³⁹. No obstante, existen pocos estudios en los que se compruebe la evolución de la miopatía tras el tratamiento de la ACO. Los síntomas articulares son reportados en aproximadamente el 70% de los ACRO en el momento del diagnóstico. Entre los síntomas musculoesqueléticos, los más habituales son la artropatía, el síndrome del túnel carpiano, la miopatía proximal, debilidad y la fibromialgia.^{140,141} Los mecanismos involucrados en la miopatía de la acromegalia no se han aclarado.

1.8. Alteraciones cardiovasculares en la acromegalia

Los cambios a nivel cardíaco en la acromegalia consisten en cardiomegalia, hipertrofia ventricular, aumento de la fibrosis y degeneración de cardiomiocitos. El mecanismo preciso que conduce a estas alteraciones es poco conocido¹³³.

En el paciente con acromegalia la enfermedad cardiovascular se puede describir en estadios, según el tiempo de evolución¹⁴². Los pacientes que son diagnosticados en una etapa temprana con una duración breve de exposición a exceso de GH/IGF-1 muestran "hipercinética" del sistema cardiovascular con mayor gasto cardíaco y disminución de la resistencias periféricas totales¹⁴². Sin embargo, si la enfermedad no se trata, progresa hacia un estado más avanzado en el que predomina la hipertensión, que acontece hasta en el 20-50%¹⁴³ de los casos. Los mecanismos que se han sugerido para este aumento de la prevalencia de la hipertensión incluyen la expansión del volumen plasmático, la estimulación del crecimiento de células musculares lisas que conllevan a mayor resistencia vascular y el aumento de la IR, entre otros¹⁴⁴.

Además de estimular la hipertrofia miocárdica, GH e IGF-I también pueden modular la estructura al prevenir la pérdida de cardiomiocitos inhibiendo la apoptosis. En este sentido, se ha propuesto que este efecto anti-apoptótico puede ser otra forma de proteger el miocardio en condiciones de lesiones isquémica^{145,146}. Así mismo la liberación local de ON promovida por IGF-1, ya explicada, anteriormente también podría jugar un papel importante.

Por otro lado la prevalencia de aterosclerosis en estos pacientes, a pesar de mayor asociación con AMHC, HTA y dislipemia no parece ser mayor a la de la población general^{147-151, 148}. Se ha propuesto la existencia de factores protectores que evitarían la aterosclerosis:

El péptido natriurético cerebral o péptido natriurético tipo B (BNP), fue llamado de este modo, debido a que fue inicialmente aislado de un extracto de cerebro porcino, sin embargo, en los humanos es producido principalmente por el miocardio, y en particular a nivel de los ventrículos. Es secretado como preproBNP (con 134 aminoácidos), experimenta clivaje y glicosilación en el retículo endoplasmático del miocito para formar proBNP (con 108 aminoácidos). Este es fragmentado por proteasas, formando el NT-ProBNP (76 aminoácidos, vida media de 60-120 min) y el BNP (32 aminoácidos vida media de 15-20 min). Ambos son liberados a la circulación de forma equimolar y tienen igual valor diagnóstico¹⁵². El efecto neto del BNP consiste en disminuir el volumen sanguíneo y el gasto cardíaco. Se secreta en respuesta a la elongación de la pared ventricular y la expansión del volumen y es buen marcador de riesgo cardiovascular incluso en pacientes sin insuficiencia cardíaca¹⁵³. Sin embargo los resultados en la acromegalia son controvertidos. Algunos estudios no encuentran diferencias de BNP entre ACRO vs grupo control^{154,155} otros grupos como el de Ito et al¹⁵⁶ encontraron que había una correlación

negativa entre los valores de BNP e IGF1 y en esta línea Andreassen et al y Verhelst et al.^{157,158}, observaron concentraciones más bajas de pro-BNP en pacientes con ACRO activa, concluyendo que estos niveles más bajos podrían explicar en parte el que los paciente con acromegalia presenten menor prevalencia de aterosclerosis que la esperada.

La grasa epicárdica (GE), es la grasa visceral del corazón y un órgano metabólicamente activo. Embriológicamente, deriva del tejido adiposo pardo¹⁵⁹. Su función fisiológica no es del todo comprendida. Se ha propuesto que actúa: a) reteniendo ácidos grasos y así evita sus efectos deletéreos en el miocardio; b) como una fuente de energía local en situaciones de alta demanda, como por ejemplo en situaciones de isquemia miocárdica, y c) dado que deriva del tejido adiposo pardo, podría servir para defender al miocardio contra la hipotermia. En relación al riesgo cardiovascular se le ha atribuido papeles antagónicos¹⁶⁰; por ejemplo, es capaz de secretar moléculas antiinflamatorias, como adiponectina¹⁶¹; sin embargo, en condiciones patológicas como la obesidad y la diabetes mellitus, este tejido es capaz de liberar a la circulación moléculas proinflamatorias y proaterogénicas como factor de necrosis tumoral alfa, visfatina, interleucinas 1 y 6, leptina y angiotensinógeno¹⁶². La mayoría de estudios, aunque transversales, relacionan la GE con el HOMA-IR²¹⁹, síndrome metabólico y riesgo de aterosclerosis^{163,164}. Sin embargo, la GE podría ser simplemente un epifenómeno asociado a la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular¹⁶⁵ El principal problema es que la GE tiene una correlación muy estrecha con otros depósitos de grasa por lo que resulta difícil separar el efecto de cada uno de estos depósitos, quizás por ello los pacientes con ACRO (con menos depósitos de grasa) serían un buen modelo para estudiar el significado intrínseco de la GE. Si el papel de la grasa epicárdica no está del todo aclarada en la población general; es del todo desconocida en la acromegalia. Se ha comunicado que el espesor de la GE medido por ecocardiografía es mayor en ACRO que en los controles, independientemente de la actividad de la enfermedad¹⁶⁶. Sin embargo en otro estudio no se encontraron diferencias cuando la GE se evaluó mediante TAC¹⁵¹ y su papel en la ACRO no está aclarado.

2. Metabolómica

2.1. Definición

La Metabolómica es el estudio sistemático del perfil metabólico de procesos biológicos. Se puede ejecutar en diferentes muestras (fluidos, tejidos, cultivos celulares, etc.) con la finalidad de mejorar nuestro conocimiento sobre las enfermedades e identificar biomarcadores.

El conjunto de metabolitos de un individuo se denomina metaboloma. El metaboloma representa la “huella metabólica” de un individuo. Este conjunto de metabolitos son el producto final de diferentes cascadas metabólicas y procesos que son el resultado de su genética y de la interacción con el ambiente.¹⁶⁷

2.2. Tipo de estrategias

En el análisis metabolómico se siguen dos tipos de estrategias que se dividen en base a si el investigador dirige o no la búsqueda de metabolitos.

2.2.1. Estudio dirigido:

Esta estrategia mide ciertos metabolitos pre-especificados y se basa en conocimientos previos. Esta estrategia tiene la ventaja de proporcionar resultados más depurados que pueden servir para detectar o validar biomarcadores, pero el inconveniente de perder una parte importante de la información. Es el método que se sigue en enfermedades pediátricas relacionadas con esteroides por ejemplo en la Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) en la cual la medición de paneles de cromatografía líquida acopladas a masas de espectrometría (LC-MS) permiten la medición simultánea de varias hormonas esteroideas mejorando la sensibilidad en el diagnóstico¹⁶⁸, otro ejemplo de aplicación exitosa es el *screening* del recién nacido en la que en una sola ejecución analítica, se pueden identificar múltiples endocrinopatías y errores innatos del metabolismo¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

2.2.2. Estudio no dirigido

Es el empleado en nuestro estudio y con este enfoque se puede detectar simultáneamente tantos metabolitos como sea posible. Por tanto, los resultados pueden generar nuevas hipótesis e impulsar el próximos pasos en la investigación o incluso detectar metabolitos desconocidos aún no anotados en las bases de datos. Además, nos permite examinar la relación entre los metabolitos interconectados en múltiples vías metabólicas y comparar perfiles metabolómicos de distintos fenotipos (por ejemplo sanos y enfermos, respondedores vs resistentes) e identificar cambios metabólicos que nos ayudan a

entender las bases fisiopatológicas de la enfermedad. Sin embargo, aún no es posible obtener todas las clases de metabolitos simultáneamente y la detección no dirigida no permite la cuantificación absoluta de los metabolitos sino a lo sumo semicuantitativa.

2.3.Aspectos metodológicos y tecnológicos en metabolómica:

El diseño experimental adecuado es crucial para garantizar la fiabilidad de cualquier estudio. En la **Figura 11** se expone un diagrama de flujo de un experimento típico de metabolómica. Los procedimientos de recolección y almacenamiento de muestras afectan la preservación del metaboloma¹⁷² (**Tabla 2**) y, por tanto, es crucial definir a priori todos estos aspectos para garantizar resultados óptimos.

Se han validado como muestras de estudio: suero, plasma, saliva, orina, líquido cefalo-raquídeo, heces, lavado bronquiolarveolar y también tejidos, entre otros^{167,172}.

2.3.1. Tipo de plataformas

Aunque existe una amplia gama de plataformas analíticas, las dos más empleadas son: la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) que es la empleada en nuestro estudio y la cromatografía líquida acoplada a masas de espectrometría (LC-MS).

Figura 11 Diagrama de Flujo de la metabolómica

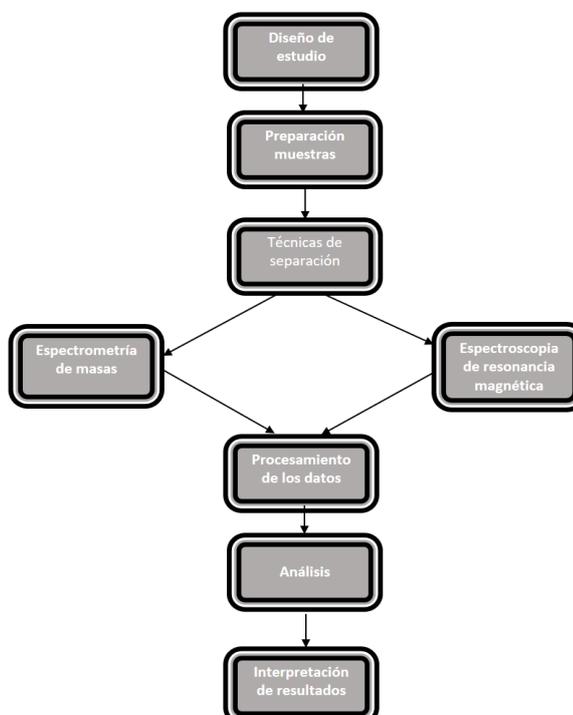


Figura 11 Diagrama de Flujo de la metabolómica indicando los factores que puedan influenciar y se han de controlar para evitar variabilidad de resultados.

Tabla 2 Factores que afectan el resultado de los estudios de metabolómica

Etapa	Impacto	Consideración
Diseño experimental	Tipo de estudio	Bases de descubrimiento, prueba de hipótesis, validación, etc. Dirigida no dirigida
	Estrategia metabolómica Población diana	Sexo, edad, origen étnico, IMC, dieta, estilo de vida, genotipo, historial médico, medicamentos, fumar, ejercicio / actividad u otros que se consideran importantes para el estudio en cuestión
Recolección de muestra	Tamaño muestra	Calculo muestral
	Tipo muestra	En ayuno, post prandial , orina, sangre , suero...
	Tiempo recolección	Misma hora (alteraciones circadianas)
	Tubos Base extracción /anticoagulante Posición paciente	Plástico, vidrio... Tipo de aditivo Sentado, acostado, de pie
Pre-procesamiento	Temperatura	Mantener a baja temperatura
	Tiempo	Procesar de inmediato
	Centrifugación	Utilizar la misma centrifuga, tiempo temperatura
	Alícuotas	Acordar volumen de alícuotas
Almacenamiento	Control de calidad	Usar un pool de muestras como registro calidad
	Etiquetado	Usar adhesivos de buena calidad Vidrio vs plástico
	Material de almacenamiento	Almacenar en distintos lugar para evitar pérdidas en caso de avería
	División de muestras	Congelado a -80° Número de ciclos de congelación / descongelación
	Temperatura	Hielo seco, hielo húmedo
	Estabilidad	Resistente al agua
	Envío Etiquetado	

Tabla 2 Se resumen los aspectos de diseño, recolección, extracción y almacenamiento de muestras que han de contemplarse previo al procesamiento de las muestras para estudio metabolómico.

2.4. Análisis bioinformáticos

Una vez procesadas las muestras se procede al análisis de resultados. En un estudio metabólico estandar, se generan una gran cantidad de datos y rangos. Para obtener resultados fiables que permitan una interpretación biomédica, es necesario validar los datos^{173,174} y un procesamiento bioinformático riguroso¹⁷⁵.

La gestión de datos generalmente se inicia con el (PCA) y (CA) por la siglas en inglés de “*principal component analysis*” y “*clustering analysis*”, que son las dos principales alternativas para revelar patrones de discriminación entre casos y controles (**Fig. 12**). Una vez que se revelan los patrones de discriminación se aplica la estadística convencional.

Figura 12 Ejemplo de tabulación PCA.

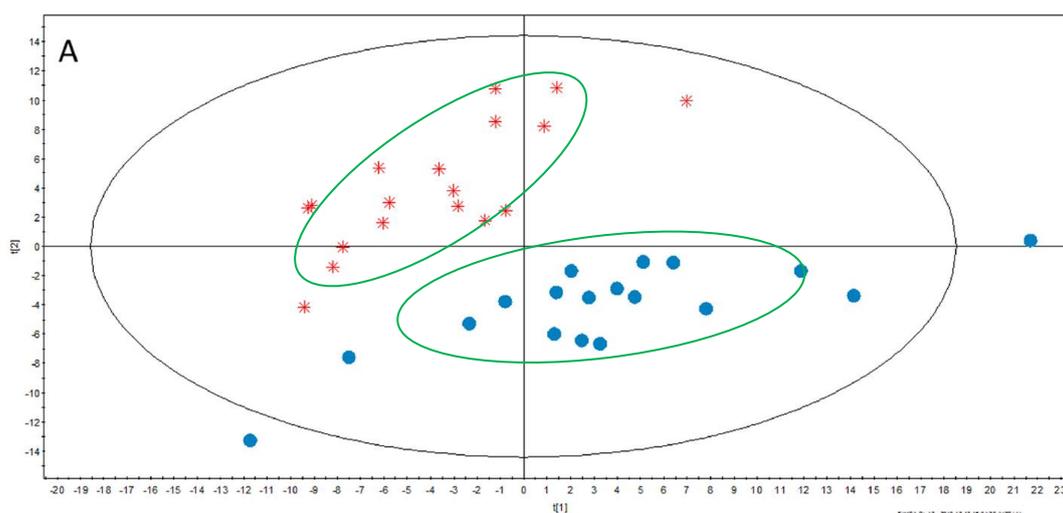


Figura 12 Esquema de los componentes principales (PCA) de todos los metabolitos en 2 grupos. Las estrellas rojas corresponden a los casos y los puntos azules a los controles. La elipse verde que delimita ambos grupos logra diferenciar bien 2 grupos.

2.5. Aplicaciones de la metabolómica en el campo de la Endocrinología

Desde hace ya algún tiempo en el campo de la endocrinología se buscan herramientas que faciliten la detección¹⁷⁶⁻¹⁷⁸, mejoren la comprensión^{179,180} y que reflejen mejor el estado de la enfermedad^{181,182}.

La metabolómica se ha posicionado como una herramienta accesible sencilla y reproducible que permite con una muestra biológica acceder a la huella metabólica de la enfermedad lo que la hace atractiva tanto para la detección como para el seguimiento de los pacientes.

En los últimos años varios trabajos han estudiado el papel de la metabolómica en el ámbito de la endocrinología^{183-193,182,194-197,179}. Se ha destacado el papel de la misma en el conocimiento y mejora del diagnóstico y son ejemplos de uso cotidiano: los errores innatos del desarrollo^{183,169-171} y la HSC,¹⁶⁸.

2.5.1. Aplicaciones en pediatría

En niños la medición de patrones hormonales desempeña un papel importante en la evaluación clínica de una serie de trastornos endocrinos comunes¹⁷⁸. Son claros ejemplo la HSC, el hiperaldosteronismo, los trastornos de diferenciación sexual, y el síndrome del ovario poliquístico; todos ellos se benefician del estudio con paneles metabólicos. Asimismo el programa de cribado neonatal con una única muestra de sangre de talón, es capaz de detectar varias patologías, entre ellas, el estudio de las metabolopatías que se basa en paneles que emplean espectrometría de masa. Asimismo, el eje hipotálamo-pituitario-adrenal se considera uno de los principales sistemas involucrados en la programación fetal y el crecimiento postnatal. Por tanto la posibilidad de medir perfiles esteroideo y hormonales en general ha despertado especial interés ya que facilita la detección y comprensión de los mecanismos subyacentes en estos procesos¹⁷⁸.

2.5.2. Aplicaciones en adulto

En adultos, el número de estudios y las aplicaciones tienen también una tendencia creciente en las publicaciones; en el ámbito de la obesidad, ha servido para constatar de forma sistemática, un aumento de los aminoácidos ramificados (BCAAs, de los aminoácidos aromáticos (AAA) y ácidos grasos saturados entre otros¹⁹⁸⁻²⁰⁰. También se ha aplicado para discriminar dentro del grupo de obesos los metabólicamente enfermos^{201,202} (que se beneficiarían aún mas de dieta) y los sensibles o resistentes a la insulina²⁰³. En el campo de la diabetes, se ha visto por ejemplo que el aumento de BCAAs se asocia a resistencia insulínica y además es un predictor de diabetes^{204,205}. En el ámbito de la endocrinología general se han aplicado estudios metabolómicos en la insuficiencia suprarrenal¹⁷⁸, nódulo adrenal con secreción subclínica de cortisol¹⁷⁷, terapia hormonal sustitutiva^{187,206}, ovario poliquístico¹⁷⁹ y en el ámbito del deporte y doping^{207,208}. También se ha propuesto el empleo de paneles esteroideos por LCMS para facilitar el diagnóstico déficit de GH del adulto^{180,209} y del Síndrome de Cushing¹⁷⁶.

Por lo tanto, está claro que las técnicas “ómicas”, y en particular la metabolómica, ha dejado de ser una técnica experimental o “novedosa” de la cual se tenía poca experiencia y se ha

posicionado en el campo de la investigación como una herramienta eficiente que aporta resultados tangibles en diferentes áreas.

2.5.3. Aplicaciones en Acromegalia

Las estrategias diagnósticas y terapéuticas en enfermedades poco frecuentes como en la ACRO se basan en el control de biomarcadores en este caso GH e IGF-1. Sin embargo, los marcadores diagnósticos no explican la evolución diferencial de los pacientes o la persistencia de comorbilidades. Una explicación para ello es que éstos marcadores modifican otros metabolitos que son en última instancia los responsables de los diferentes fenotipos y heterogeneidad evolutiva de los pacientes. El progreso en la estandarización y mayor accesibilidad a las técnicas "ómicas" ofrece una gran oportunidad de profundizar en los mecanismos moleculares que contribuyen al desarrollo o son consecuencia de enfermedades poco frecuentes como la ACRO. Esto nos permitirá ofrecer abordajes más personalizados para el cuidado del paciente. Hasta el momento de la redacción de la presente tesis no se han publicado estudios específicos que hayan empleado la metabolómica en pacientes con ACRO, por lo que entendemos que es un campo muy interesante a explorar.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Los pacientes con acromegalia presentan una serie de alteraciones metabólicas y complicaciones crónicas entre ellas la miopatía¹³⁷ que no siempre revierten totalmente a pesar del control/remisión de la enfermedad. Aunque los niveles de GH e IGF-1 se emplean para monitorizar el tratamiento, estos no siempre se correlacionan de forma estrecha con la morbilidad y calidad de vida de los pacientes¹⁵. El estudio del perfil metabólico masivo a través de la metabolómica podría ayudar a comprender la fisiopatología subyacente.

Partimos de la hipótesis de que los pacientes con acromegalia tienen una huella metabólica distinta a los individuos sanos. Para verificar esta hipótesis utilizamos un diseño de cohorte transversal con 30 pacientes expuestos a GH, con acromegalia y 30 controles equiparados por edad sexo índice de masa corporal y tabaquismo sin acromegalia ni exposición a GH previa y comparamos ambos perfiles metabólicos o “metabolomas” en busca de diferencias.

Con estas consideraciones previas los objetivos concretos son:

Objetivo principal:

1. Examinar si existe diferencia en la huella metabólica entre pacientes con acromegalia y controles sin acromegalia.

Objetivos secundarios

2. Investigar si hay diferencias en la huella metabolómica entre pacientes con ACRO activa y pacientes con ACRO controlada con tratamiento o en remisión.
3. Identificar biomarcadores i/o vías metabólicas que nos ayuden a comprender las comorbilidades y su relación con los niveles de GH/IGF1
4. Explorar si la huella metabólica es capaz de identificar factores no clásicos de riesgo cardiovascular

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño:

Estudio de cohorte transversal caso-control que incluye 30 pacientes con ACRO y 30 controles equiparados por edad, sexo, IMC y hábito tabáquico.

2. Ámbito:

Los pacientes fueron reclutados de forma consecutiva de las consultas externas de alta complejidad de patología Hipotálamo hipofisaria del Hospital Vall Hebron y todos ellos seguían controles en nuestro centro en los últimos 5 años.

3. Población de estudio:

Se reclutaron pacientes con acromegalia de forma consecutiva (entre febrero de 2016 y enero de 2017). Todos los pacientes eran autónomos, sin deterioro cognitivo y de forma voluntaria desearon participar en el estudio. Los sujetos control (equiparados por edad, sexo, IMC y hábito tabáquico) fueron personal del hospital y familiares o amigos de los pacientes.

El diagnóstico de acromegalia y su actividad se estableció siguiendo la guía de Katznelson 2014²¹⁰

Los pacientes fueron subdivididos en los siguientes grupos para su estudio:

3.1. Grupos de estudio:

3.1.1. Pacientes ACRO o casos:

Se subdividieron en tres cohortes teniendo en cuenta los niveles de IGF-1 y la toma o no de medicación para tratar la acromegalia:

3.1.1.1. Pacientes con IGF-1 normal:

Pacientes que cumplan criterios de control bioquímica de su enfermedad (n=25): GH basal < 1 ng/mL o tras sobrecarga oral de glucosa < 0,4 ng/mL e IGF-I normal para edad y sexo, con o sin tratamiento médico. Dentro de este grupo se distingues 2 subgrupos:

3.1.1.1.1. Acromegalia curada o en remisión (n=11) (ACRO_RE):

Son los pacientes que cumplan criterios de control bioquímico de su enfermedad: GH basal o tras sobrecarga oral de glucosa < 0,4 ng/mL e IGF-I normal para edad y sexo y están sin tratamiento médico.

3.1.1.1.2. Acromegalia controlada (n=14) (ACRO_CO):

Se consideran pacientes controlados (n=14) (ACRO_CO) los que cumplen criterio de control bioquímico, pero están con tratamiento médico.

3.1.1.2. Pacientes con acromegalia activa: (ACRO_A):

Son los pacientes que no cumplan criterios de control bioquímico de su enfermedad, es decir siguen con acromegalia activa (n=5) a pesar de tratamiento médico.

3.2. Criterios de inclusión:

3.2.1. Grupo de pacientes con acromegalia:

Se incluyeron de forma consecutiva todos los pacientes diagnosticados y tratados de acromegalia en nuestro centro en los últimos 5 años, autónomos y sin deterioro cognitivo, que de forma voluntaria aceptaron participar del estudio y firmaron el consentimiento informado representa un 50 % de nuestros pacientes en seguimiento activo

3.2.2. Grupo de controles:

Individuos sin acromegalia, autónomos, sin deterioro cognitivo equiparados por edad, sexo, diabetes, IMC y tabaquismo con los pacientes ACRO. Todos aceptaron participar del estudio y firmaron el consentimiento informado.

3.3. Criterios de exclusión:

Son válidos tanto para casos como para los controles

- Deterioro cognitivo
- Diabetes tipo 1
- Enfermedad orgánica severa, renal hepática o cardíaca
- Cáncer en tratamiento activo
- Receptor trasplante de órgano
- Hepatitis
- Tratamiento con cualquier fármaco que aumente la IR, (ex. cortisona, psicofármacos, antiretrovirales) Abuso de drogas
- Embarazo o lactancia

3.4. Tratamiento de los casos:

Al inicio del estudio, dentro del grupo ACRO_A, (n= 5), tres estaban en tratamiento con análogos de somatostatina (AASS) y dos con un antagonista del receptor de GH pegvisomant (PEG), ninguno de ellos en combinación. En el grupo ACRO_CO (n=14), había dos con PEG, seis en AASS, dos en combinación PEG + AASS y cuatro con cabergolina. Los ACRO_RE (n=11) eran pacientes en

remisión sin tratamiento médico. Los 30 pacientes habían sido sometidos a cirugía transesfenoidal que no fue curativa y diez habían recibido radioterapia hacía más de 10 años antes, (1 en ACRO_A, 6 en ACRO_CO y 3 en ACRO_RE).

4. Medida de la muestra

La Acromegalia como hemos referido es una enfermedad poco frecuente, de las consideradas “enfermedades raras”. En este tipo de patologías los estudios clínicos se realizan, con el mayor número posible de “pacientes disponibles”. Hemos realizado el estudio con el 50% de los pacientes disponibles que se controlan en nuestra unidad por lo que consideramos que es una muestra representativa

IV. PROCEDIMIENTO

IV. PROCEDIMIENTO:

1. Anamnesis:

El día que los participantes venían a la extracción venosa para analítica se procedía a constatar que habían dado el consentimiento por escrito y no tenían dudas sobre el mismo. Se realizó también una evaluación clínica y exploración física (datos de filiación, hábitos tóxicos, nivel educativo, actividad laboral, antecedentes patológicos, peso, talla, perímetro de cintura, TA).

2. Evaluación Cardiovascular

Aparte de la frecuencia cardíaca, presión arterial y ECG, se midió mediante ecografía de alta resolución el grosor de la íntima media carotídea bilateral y se practicó un ecocardiograma que contenía la información estándar recomendada por las guías²¹¹ y medición de la grasa epicárdica. Ecocardiográficamente, la grasa epicárdica se identificó como el espacio entre la pared externa del miocardio y la capa visceral del pericardio. Este espesor se midió de forma perpendicular sobre la pared libre del ventrículo derecho al final de la sístole en 3 ciclos cardíacos (utilizamos el promedio de las tres mediciones)²¹².

3. Parámetros séricos y hormonales:

Se realizó una extracción de sangre venosa tras 8 horas de ayuno en sedestación. La extracción de sangre se realizó con tubos de EDTA (K3E) con inhibidor de proteasa (BD Vacutainer-Aprotinin 250KIU Ref 361017), EDTA (BD Vacutainer K2E (EDTA) 7,2 mg Ref. 368861) y sin aditivo (BD Vacutainer SSTII Ref 366468). Las determinaciones hormonales y análisis se midieron con técnicas habituales o con los kits específicos (ELISA en su mayoría) en el Laboratorio de Bioquímica y Hematología del Hospital

Las concentraciones de IGF-I se midieron utilizando un ensayo de quimioluminiscencia IGF-I de Liaison XL (Liaison XL-Diasorin, Italia). El ensayo está referenciado al 1er Estándar Internacional de la OMS para el código IGF-I NIBSC: 02/254, el límite de detección es 3 ng / ml. La GH fue medida por ImmuliteXP (Siemens Healthcare, EUA); el ensayo está referenciado a la segunda sensibilidad analítica estándar internacional NIBSC 98/574 de la OMS 0.01 ng / mL

Las muestras se dividieron en dos partes, una en la que se determinaron los parámetros hormonales y bioquímicos en el laboratorio del hospital: hemograma, bioquímica general, insulina, péptido C, BNP,

perfil hormonal, (GH, IGF1, LH , FSH, estradiol, testosterona, TSH T4libre, ACTH, cortisol, renina aldosterona), metabolismo lipídico: HDL IDL TG Lpa, homocisteína, fibrinógeno Apo A1, Apo E , lipasa, citoquinas inflamatorias: PCR,IL6 ,Leptina, Adiponectina, TNF α , Galectina-3, Cistatina-C y Cardiotrofina-1 .

La otra parte de la muestra se centrifugó y congeló a -80°C y fue la que se empleó para el estudio metabólico que se llevó a cabo en el laboratorio de VHIR.

4. Definición de variables:

La obesidad se definió como un IMC ≥ 30 kg / m². La hipertensión se definió como presión arterial sistólica > 140 mmHg o presión arterial diastólica > 90 mmHg o el uso de medicamentos antihipertensivos. La dislipemia se definió como colesterol total (TC) > 230 mg/dl, lipoproteínas de baja densidad (LDL) > 160 mg/dl, triglicéridos > 150 mg/dl o tratamiento con medicamentos hipolipemiantes.

El índice HOMA-IR se calculó con la fórmula de Matthews²¹³ (insulina basal (mU/l) * glucosa basal(mg/dl) / 405) que fue de 1.9 ± 2.8 en los casos y $3,0 \pm 2.6$ en los controles.

El HOMA-B se calculó: insulina (mU/l) * 360 / (glucosa (mg/dl) - 63), tal como ha sido previamente reportado^{214,215,213}

5. Estudio metabólico:

Las muestras reservadas para el estudio metabólico se procesaron de la siguiente forma: se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante (plasma y suero) se transfirió a un tubo de plástico (poliestireno) y se alícuotó en dos tubos que se congelaron a -80°C hasta su procesamiento en el laboratorio de VHIR.

En nuestro estudio metabólico, se empleó una estrategia no dirigida, la plataforma analítica fue 1H-RMN que nos permite determinar los metabolitos mediante las señales espectroscópicas. Para confirmar la asignación se comparan los resultados con la de bases de datos HMDB (Human Metabolome Database)²¹⁶ y la Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB)²¹⁷ y la adición de estándares conocidos en el caso de dudas. Los espectros se normalizaron para la intensidad total para minimizar las diferencias en la concentración y errores experimentales durante el proceso de extracción. La integración se realizó con Global Spectra Deconvolution (GSD) Software: MestreNova 8.1

Los niveles de metabolitos se registran en unidades arbitrarias (UAs) que son las concentraciones de cada metabolito normalizadas en la muestra

6. Recogida de datos:

Se diseñó un cuaderno de recogida de datos (CRD) con su correspondiente manual de codificación, del que posteriormente se confeccionó una base de datos. En ambos grupos se recogieron los parámetros clínicos y se volcaron los datos bioquímicos y del estudio metabólico. En los pacientes con acromegalia además, se recogieron detalladamente las variables relacionadas con su enfermedad: fecha del diagnóstico, duración estimada de síntomas, tratamientos recibidos (cirugía, análogos de somatostatina, pegvisomant, agentes dopaminérgicos, etc. con dosis y fechas). También se registraron las fechas de remisión y /o recidiva, así como la presencia de hipopituitarismo, fecha de aparición, dosis de tratamiento sustitutivo. etc.

7. Protección de datos personales

El presente estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, la International Conference of Harmonisation (ICH) y siguiendo las normas de Buena Práctica Clínica (BPC de la ICH). El protocolo, consentimiento informado, hoja de información de los participantes y los documentos aplicables se sometieron a evaluación por el CEIC de nuestro Hospital Vall d'Hebron (número de protocolo PR(AG)198/2015)

En todos los casos, previa a la realización de cualquier intervención se explicó detenidamente el protocolo de estudio y se solicitó la firma por parte del sujeto del consentimiento informado por escrito.

En la base de datos informática el paciente fue identificado por un número de código interno, que fue desconocido para el investigador, con el fin de que sus datos clínicos no pudieran asociarse y que fueran ciegos para todos los investigadores.

8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo para verificar la correcta introducción de los datos en la base de datos. Los datos cuantitativos se expresan como media y SD (distribución gaussiana) o como mediana (p50) con rango intercuartil (IQR; distribución no gaussiana) y los datos categóricos como porcentajes. La distribución de los datos se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizaron transformaciones logarítmicas cuando fue necesario para normalizar la distribución. La comparación entre dos grupos se realizó utilizando la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney, según correspondiera. Para la comparación de variables categóricas se utilizó la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher. Las correlaciones se evaluaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson o la correlación de rango de Spearman dependiendo de si los datos seguían o no una

distribución normal. Las comparaciones de las medianas en los tres grupos (ACRO_A, ACRO_CO y ACRO_RE) se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las tendencias con el test de Jonckheere-Terpstra (JT-TT). Se emplearon análisis univariantes y multivariantes para valorar la relación entre los distintos tipos de variables evaluadas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico STATA14 para Windows. La significancia estadística se aceptó en $p < 0.05$.

El análisis metabolómico multivariado partió de las tablas de metabolitos generadas a partir de la integración de los espectros univariados tipificados (cada valor se resta la mediana y se divide por la desviación estándar de la variable). El análisis de componente principal (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados ortogonales (OPLS) y parciales de proyección sobre estructura latente (PLS-DA) se realizó con SIMCA-P 13.0 (Umetrics, Suecia).

IV. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Análisis descriptivo

En la **Tabla 3** se muestran las características basales de los pacientes y los controles equiparados por sexo, edad, IMC y hábito tabáquico.

No apreciamos diferencias estadísticamente significativas entre sujetos con ACRO y controles respecto a factores de riesgo cardiovascular (FRCV) clásicos como la presencia de diabetes, HTA, dislipemia.

De forma sorprendente encontramos que el HOMA-IR fue menor en los pacientes con ACRO que en los controles, pero sin llegar a la significación estadística. Tampoco encontramos diferencias de HOMA en relación al sexo de los pacientes.

Tal como era de esperar los pacientes con ACRO presentaron en su conjunto niveles significativamente elevados de GH e IGF-1 en comparación con los sujetos control.

Tabla 3 Características basales de los pacientes y los controles apareados

	Casos (n=30)	Controles (n=30)	p
Sexo masculino (n/%)	16 (53.3%)	16 (53.3%)	0.68
Edad años (M+/-SD)	55.53 ± 11.3	52.4 ± 10.8	0.22
IMC kg/m ² (M +/-SD)	29.7 ± 5.7	27.3 ± 5.2	0.07
Fumador (n/%)	5 (16.7%)	5 (16.7%)	0.95
Diabetes (n/%)	7 (23.3%)	6 (20.0%)	0.81
Hipertension (n/%)	8 (26.7)	11(36.7%)	0.36
Dislipemia (n/%)	11(36.7%)	14(46.7%)	0.37
Homa-IR p50-(IQR)	1.9(2.8)	3.0 (2.6)	0.06
Homa-B p50-(IQR)	131.3 (137.1)	164.3(92.0)	0.24
GH ng/dl p50-(IQR)	0.63 (2.69)	0.31(0.71)	0.03
IGF-1 ng/dl (M +/-SD)	216.1±192	143.0±58	0.01

Tabla 3: Características basales de ambos grupos. No hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos excepto en GH e IGF-1 SD: desviación estándar p50: percentil 50 (mediana) IQR (rango intercuartil. HOMA-IR: modelo homeostático de resistencia a la insulina. HOMA-B: función beta

En la **Tabla 4** se muestra la distribución de FRCV clásicos en el grupo de pacientes según el estado de su enfermedad. Es de destacar que la diabetes estaba presente en los pacientes con acromegalia activa y controlada y no en los pacientes curados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En el resto de FRCV (sexo, edad, IMC, tabaquismo, hipertensión y dislipemia) no encontramos diferencias significativas entre los grupos

El IGF-1 y la GH mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, siendo más altos en ACRO_A y ACRO_CO en comparación con el grupo de ACRO_RE ($p < 0.01$ en todas las comparaciones).

Tabla 4 Estado de enfermedad de los pacientes acromegálicos y FRCV.

	ACRO_A (n=5)	ACRO_CO (n=14)	ACRO_RE (n=11)	p
Sexo masculino (n/%)	2 (40.0%)	9 (64.0%)	5 (45.0%)	0.55
Edad años (M+/-SD)	51.4 ± 9.2	60.3±11.1	51.4 ± 10.9	0.09
IMC kg/m ² (M +/-SD)	29.7 ± 7.4	27.6 ± 4.1	32.1 ± 6.1	0.14
Fumador (n/%)	2 (40.0%)	2 (14.3%)	1(9.1%)	0.28
Diabetes (n/%)	2 (40.0%)	5 (37.7%)	0 (0.0%)	0.04
Hipertension (n/%)	2 (40.0%)	5(37.7%)	1(9.1%)	0.30
Dislipemia (n/%)	1 (20.0%)	6(20.0%)	4(42.9%)	0.88
Homa-IR p50-(IQR)	2.9 (1.88)	1.8 (3.03)	1.7 (2.57)	0.50
Homa-B p50-(IQR)	132.1 (114.9)	110.2 (155.8)	135.1(102.2)	0.72
GH ng/dl p50-(IQR)	5.0 (7.9)	0.8 (2.2) ^a	0.4 (0.5) ^a	0.01
IGF-1 ng/dl (M +/-SD)	392 ± 121.9	216.4 ± 100.0 ^b	179.0 ± 115.0 ^a	0.01

Tabla 4: La tabla muestra las 3 cohortes de ACRO. Hay diferencias en la frecuencia de diabetes GH e IGF-1 siendo mayores en pacientes con enfermedad activa. Valores p: prueba exacta de Fisher para variables categóricas y Kruskal-Wallis para variables continuas. ^a vs. ACRO_active, $p < 0.05$; ^b vs ACRO_remission, $p < 0.05$ ACRO: Acromegalia, SD: desviación estándar p50: percentil 50 (mediana) IQR: rango intercuartil HOMA-IR: modelo homeostático de resistencia a la insulina. HOMA-B: función beta

Respecto a los marcadores no clásicos de riesgo cardiovascular (**Tabla 5**) el BNP fue más elevado en el grupo ACRO respecto a los controles (3.12 ± 0.89 vs 2.13 ± 0.87 pg/mL $p < 0.001$) (**Fig. 13A**). No apreciamos diferencias significativas en los niveles de BNP en relación al grado de actividad de la enfermedad. Sin embargo, curiosamente el aumento de BNP, fue a expensas principalmente del grupo de pacientes con ACRO_CO (**Fig. 13 B**). Finalmente, no observamos relación entre el pro-BNP y la presencia de HTA ni con los parámetros ecocardiográficos analizados: volumen telediastólico, volumen telesistólico y grosor de tabique.

Tabla 5 Marcadores no clásicos de riesgo cardiovascular en ambos grupos

	Casos (n=30)	Controles (n=30)	p
APO A1 (mg/dL) (M+/-SD)	5.07 ± 0.16	5.08 ± 1.68	0.91
ApoB (mg/dL) (M+/-SD)	4.56 ± 0.20	4.58 ± 0.24	0.46
PCR (mg/dL) (M+/-SD)	-1.80 ± 1.14	-1.59 ± 1.14	0.52
Adiponectina(µg/mL) (M+/-SD)	2.45 ± 0.54	2.28 ± 0.63	0.36
Galectina-3 (ng/m) (M+/-SD)	1.73 ± 0.41	1.88 ± 0.12	0.15
BNP ((pg/mL) (M+/-SD)	3.12 ± 0.89	2.13 ± 0.87	0.01
Homa-IR p50-(IQR)	1.9(2.8)	3.0 (2.6)	0.06
Homa-B p50-(IQR)	131.3 (137.1)	164.3(92.0)	0.24
GH ng/dl p50-(IQR)	0.63 (2.69)	0.31(0.71)	0.03
IGF-1 ng/dl (M +/-SD)	216.1±192	143.0±58	0.01

Tabla 5. Distribución de factores no-clásicos de riesgo cardiovascular en ambos grupos. Se han transformado las variables (ApoA1, ApoB, PCR, Adiponectina, Galectina 3 y BNP) a su logaritmo para normalizar. ApoA1: apolipoproteína 1, ApoB: apolipoproteína B, PCR: proteína C reactiva, BNP: péptido natriurético cerebral. p: ttest en las normalizadas y U de Mann–Whitney en las variables que no cumplen criterio de normalidad.

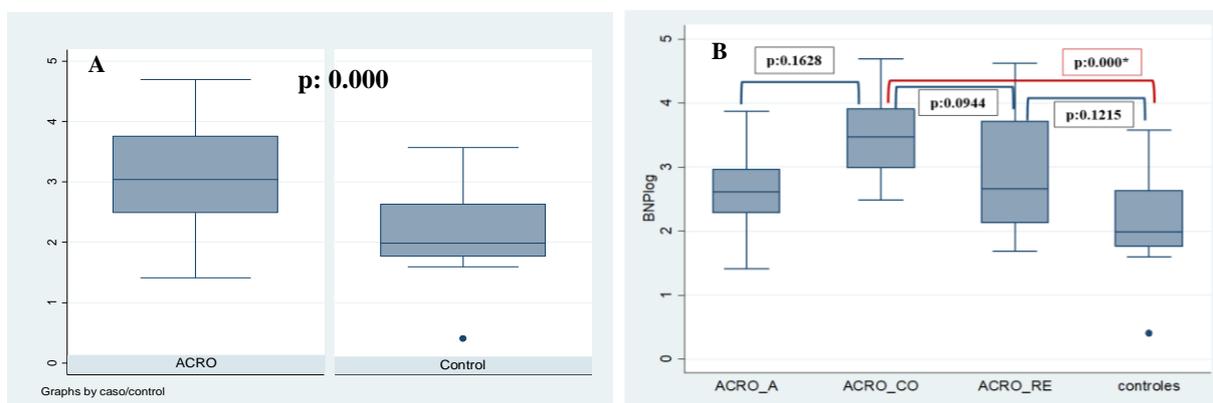


Figura 13: Boxplot de BNPlog A :ACRO vs controles, B: Separados en 4 grupos, no hay diferencias intergrupo excepto, a expensas de ACRO_CO vs control. p de Kruskal–Wallis con corrección de bonferroni. ACRO_A (ACRO activos n=5) ACRO_CO (ACRO controlados con tratamiento n=14) ACRO_RE (ACRO en remisión sin tratamiento n=11) BNPlog (logaritmo de BNP para normalizar la variable) BNP: péptido natriurético cerebral

Parámetros morfológicos cardiovasculares:

Con respecto a las variables derivadas de la ecografía de troncos supraaórticos y la ecografía cardíaca, no encontramos diferencias respecto al grosor de la íntima media carotídea (GIMC), grosor de tabique (GT) ni en el tiempo de desaceleración de la onda E (TDE) entre ACRO y controles. Sin embargo, los pacientes con ACRO tenían mayor grasa epicárdica (GE) en comparación con el grupo control (Tabla 6 y Figura 14).

Tabla 6: Parámetros ecocardiográficos en ambos grupos

VARIABLES	Casos (n=30)	Controles (n=30)	p
GIMC mm	0.09 ± 0.26	0.09 ± 0.25	0.584
GT mm	11.31 ± 1.38	10.65 ± 1.48	0.200
TDE ms	231.24 ± 44.38	235.37 ± 67.96	0.583
GE cm	0.65 ± 0.16	0.44 ± 0.14	0.035

Tabla 6: Distribución en ambos grupos de las diferentes variables expresadas en media y desviación estándar. GIMC: grosor de la íntima media carotídea GT: grosor de tabique interventricular, TDE: tiempo de desaceleración de la onda E, GE: grasa epicárdica.

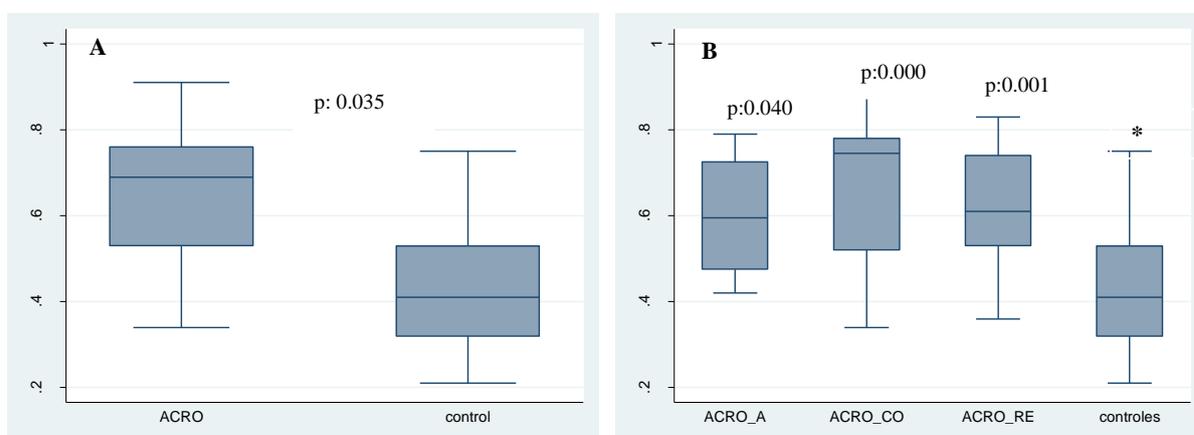


Figura 14: Distribución de la grasa epicárdica en ambos grupos A): Pacientes con acromegalia vs controles. B): Separados en 4 grupos, encontramos que las diferencias son sólo respecto a los controles y no intragrupo. (*) Las p se refieren a las diferencias de cada grupo ACRO respecto a los controles.

La GE no correlacionó con la presencia de diabetes, HOMA-IR, GH o IGF1 o grado de actividad de la ACRO .

2. Perfil metabólico

Como se muestra en **Figura 15**, el modelo (discriminante de mínimos cuadrados ortogonales y parciales) OPLS fue capaz de separar en 2 grupos a los pacientes con ACRO de los controles emparejados sobre la base de las diferencias de metabolitos plasmáticos. El modelo fue validado por permutación y validación cruzada.

Figura 15: Análisis discriminante metabólico

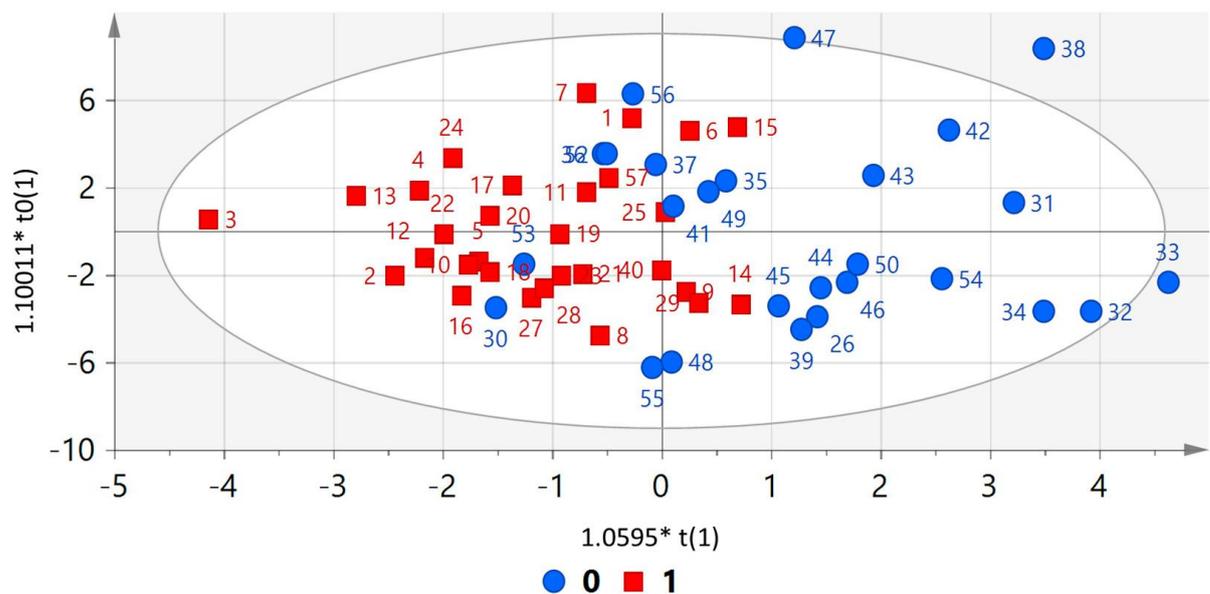


Figura 15 Se visualiza a la izquierda en rojo el grupo de pacientes con acromegalia y en azul a la derecha los controles. Las variables de entrada son datos de metabólica. $R^2Y = 0,42$, $Q^2 = 0,16$ UV. Permutación $R^2 = 0,217$, $Q^2 = -0,333$. CV-Anova: 0,066.

2.1. Análisis comparativo

Los principales metabolitos que discriminan ambos grupos detectados con la técnica de estudio metabolómico se muestran en la **Tabla 7**. Los niveles plasmáticos de aminoácidos esenciales estaban disminuidos en pacientes con ACRO en comparación con los sujetos control. Entre los aminoácidos esenciales individuales, aparte de los niveles más bajos de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), solo la lisina fue significativamente menor en pacientes con ACRO. El lactato también se detectó a menores niveles en los sujetos con ACRO. Por el contrario, la dimetilamina se encontró más elevada en los pacientes con ACRO que en el grupo control.

Tabla 7: Principales metabolitos que diferencia a los pacientes de los controles

	ACRO p50 (IQR)	Control p50 (IQR)	p value Man Whitney
<i>Lisina</i>	0.72 (0.05)	0.78 (0.08)	0.003
<i>Lactato</i>	12.26(2.78)	14.85 (5.20)	0.002
<i>Valina</i>	4.75 (0.87)	5.20 (1.06)	0.010
<i>Isoleucina</i>	2.5 (0.41)	2.80 (0.51)	0.021
<i>Dimethylamina</i>	1.3 (0.18)	1.20 (0.18)	0.020

Tabla 7: Unidades arbitrarias de los principales metabolitos que diferencian a ambos grupos. Aparte de las diferencias observadas en los aminoácidos de cadena ramificada, solo la concentración de lisina y lactato fue estadísticamente más baja en ACRO; por el contrario, la dimetilamina fue mayor. ACRO: Acromegalia p50: percentil 50 (mediana) IQR:(rango intercuartil)

Cuando analizamos estos parámetros según el estado de la enfermedad (**Tabla 8**), solo la lisina y los BCAAs (valina e isoleucina) siguen siendo más bajos en pacientes con enfermedad activa. Sin embargo, solo la valina tuvo una prueba de tendencia positiva (JT-TT) (b -Tau 0.30 p: 0.04)

Tabla 8 Concentración de aminoácidos en relación al estado de la enfermedad en los pacientes

	ACRO_A (n=5)	ACRO_CO (n=14)	ACRO_RE (n=11)	Jonckheere-Terpstra Tau_b and p	
<i>Isoleucina</i>	2.50 ± 0.18	2.46 ± 0.44	2.67± 0.33	0.26	0.08
<i>Lisina</i>	0.69 ± 0.02	0.71± 0.08	0.73± 0.03	0.28	0.06
<i>Valina</i>	4.30 ± 0.24	4.71± 1.02	5,00 ±0.54	0.30	0.04

Tabla 8 Se muestra la mediana y el rango intercuartil de concentración de aminoácido en Unidades Arbitrarias en cada grupo de pacientes de acuerdo al estado de la enfermedad y la prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra.

2.2. Análisis inferencial

Los resultados con respecto a la correlación de Spearman entre los BCAAs y GH o IGF-1 se muestran en la **Figura 16**. Los niveles séricos de GH se correlacionaron negativamente con la valina ($r: -0.38, p < 0.01$) y la isoleucina ($r: -0.56, p: 0.00$) tanto en la población total como en el grupo ACRO: valina ($r-0.44, p < 0,02$) e isoleucina ($r-058, p < 0,00$). No se encontró ninguna correlación entre IGF-1 y los BCAAs en toda la población o cuando en el análisis solo se incluían los pacientes con ACRO

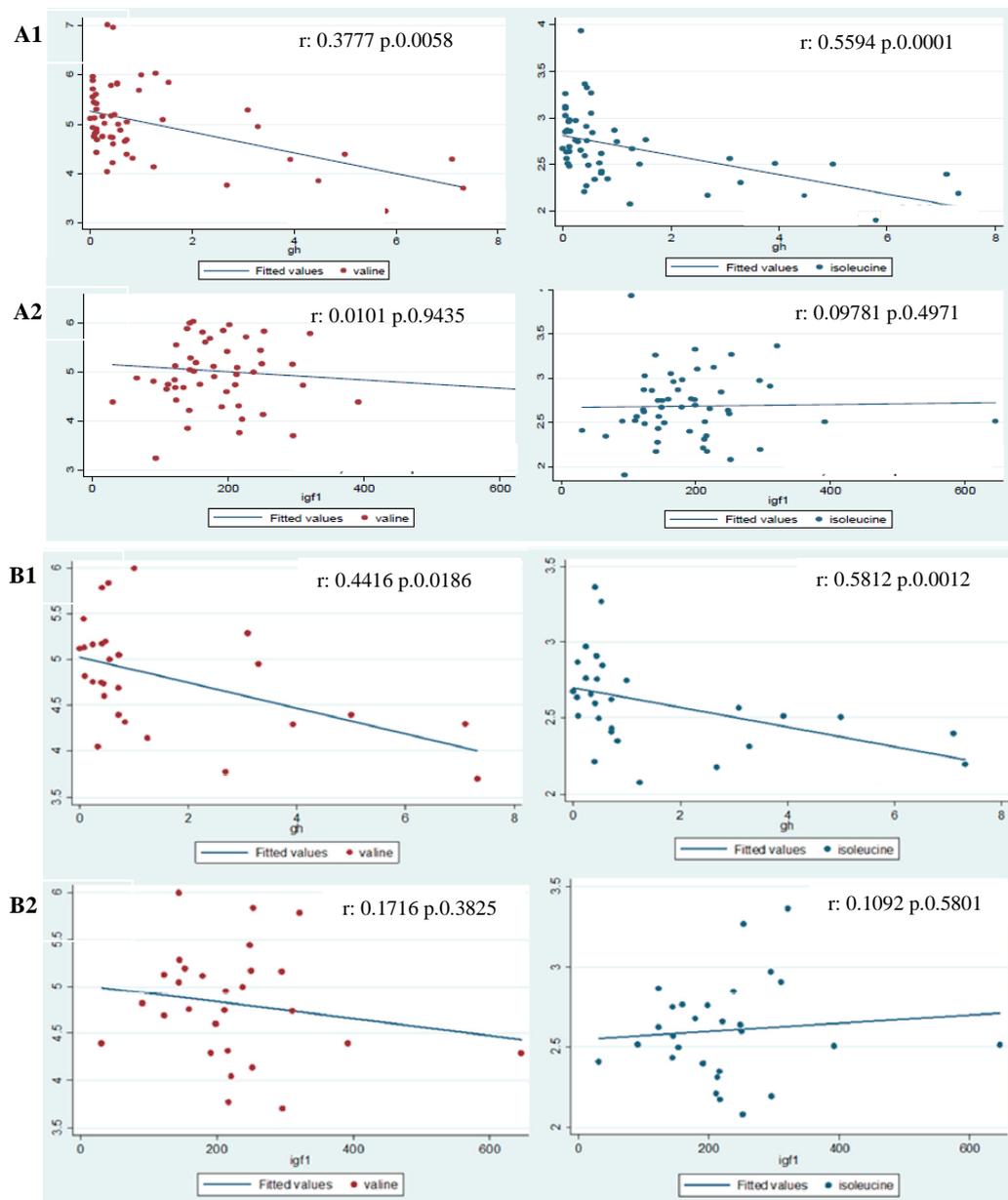


Figura 16: Correlaciones de Spearman entre BCAAs (valina e isoleucina) con GH e IGF1 en todo el grupo (A1 y A2) y en pacientes con acromegalia (B1 y B2). La GH (hormona del crecimiento) y el IGF1 (factor de crecimiento similar a la insulina) se expresan en ng / ml y los BCAAs (aminoácidos de cadena ramificada expresados) se expresan en UAs. r : coeficiente de correlación de rango de Spearman.

Los BCAAs no correlacionaron con BNP pero si con la GE (**Fig 17**). Además, en el modelo de regresión múltiple de exclusión por pasos (**Tabla 9**), en el que se introdujeron como variables independientes: (sexo, IMC, HTA, DM2, HOMA-IR, GH, IGF1. Solamente, tener ACRO (β 0.186, $p=0.000$), los BCAAs y la GH (β -0.035, $p=0.027$) fueron predictores independientes de la grasa epicárdica en un modelo con R^2 : 0.52)

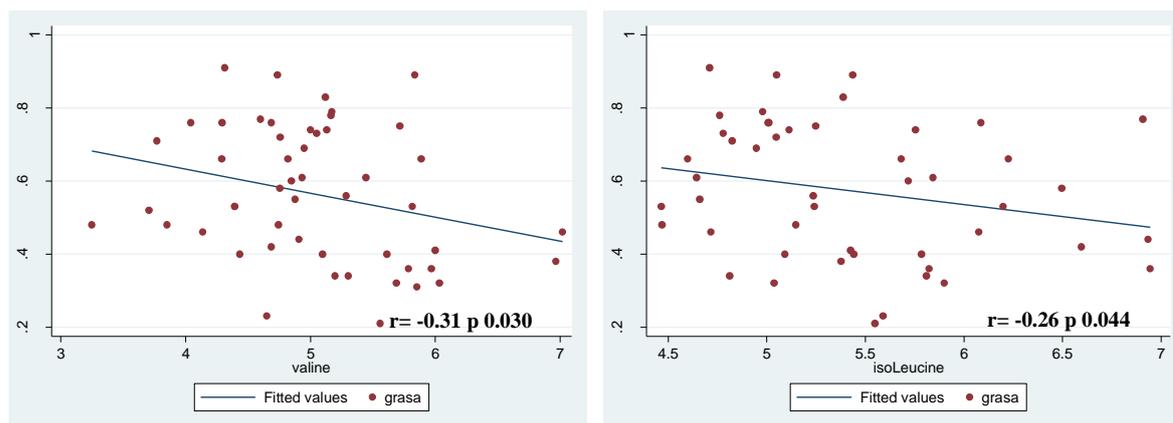


Figura 17: Correlación de Spearman BCAAs grasa epicárdica. *r*: coeficiente de correlación de rango de Spearman La figura muestra las correlaciones de Spearman de BCAA (valina e isoleucina) con grasa epicárdica.

Tabla 9: Modelo de regresión múltiple con grasa epicárdica como variable dependiente

Variabes	R ²	Beta	T: value	p: value
	0.5244			
ACRO		0.186	4.36	0.000
GH		-0.035	-2.29	0.027
Valina		-0.977	-3.70	0.001
Isoleucina		-0.108	-2.84	0.007

Tabla 9: Modelo final explicativo de regresión múltiple de grasa epicárdica. Se introdujeron como variables independientes: (sexo, IMC, HTA, DM2, HOMA-IR, GH, IGF1, valina, isoleucina y tener ACRO) ACRO: acromegalia, GH: hormona de crecimiento

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio los pacientes con acromegalia de una muestra representativa de nuestra consulta, tuvieron mayor grasa epicárdica, BNP más elevado y niveles más bajos de BCAAs que los sujetos control. El descenso de BCAAs se relacionó con GH, el grado de actividad de la enfermedad y explicó en parte el aumento de grasa epicárdica en esta población

1. Acromegalia y riesgo cardiovascular

La acromegalia activa se caracteriza por mayor prevalencia de hipertensión arterial que acontece hasta en el 60%^{143,218} y AMHC o diabetes que se observa hasta en el 30-50%²¹⁹⁻²²¹, Sin embargo a pesar de esto la aterosclerosis en la ACRO, no parece ser mayor que en la población general¹⁴⁷⁻¹⁵¹, por lo que se podría postular la existencia de un efecto protector frente a la formación de la placa de ateroma por parte de la GH, IGF1 u otros factores aún por identificar.

El grupo de pacientes ACRO de nuestro estudio estaba equiparado con el grupo control en los FRCV clásicos como son el sexo la edad el IMC y el hábito tabáquico. Sin embargo es de destacar que tampoco encontramos diferencias en la presencia HTA (26.7%, vs 36.7% p: 0.360), diabetes (23.3 vs 20.0% p: 0.8), dislipemia (36.7 vs 6.7 p: 0.37) o HOMA-IR (1.9±2.8 vs 3.0 ±2.6 p:0.06). De hecho el HOMA-IR tendió a ser mayor en los controles que en el grupo con ACRO. Estos hallazgos pueden estar justificados por el hecho de que en nuestro estudio el grupo de pacientes con ACRO, lo conformaban en su mayoría pacientes ACRO_CO (n=14) en objetivo de GH/IGF1 bajo tratamiento médico, o ACRO_RE (n=11) sin tratamiento y en remisión; es decir, pacientes sin enfermedad activa.

La falta de relación entre la acromegalia y la IR medida por HOMA merece un comentario específico porque va en contra del concepto tradicional basado en la IR como la razón principal de la diabetes en pacientes con ACRO²²²⁻²²⁶. De hecho, encontramos menos HOMA-B en pacientes con ACRO que en los controles. En nuestra cohorte el tratamiento con análogos de somatostatina podría modificar la secreción de insulina y la sensibilidad a la insulina²²⁷⁻²³¹, contribuyendo así a este hallazgo. Sin embargo, Olarescu et al¹⁰⁵, en un elegante trabajo en el que se incluyeron pacientes ACRO recién diagnosticados y no tratados, encontraron que la presencia de tejido adiposo visceral (VA) en lugar de la activación de GH / IGF-1 era el factor principal que explicaba la IR en pacientes con ACRO¹⁰⁶.

Los valores de HOMA en la población general sin ACRO son muy variables dependiendo de la población de referencia (**Tabla 10**). Asimismo, como se puede apreciar en la (**Tabla 11**) los valores de HOMA-IR en diferentes series de ACRO activos son muy variables, y muchos no presentan los

valores típicos de HOMA-IR observados en la prediabetes o en etapas tempranas de la diabetes tipo 2. Por ejemplo la serie de ACRO de Briet^{232,233} tiene un HOMA basal de 2.25 siendo el HOMA para IR de su población de referencia 3.8²³⁴ En general, estos hallazgos sugieren que el empleo de la fórmula HOMA (sobre todo en pacientes bajo tratamiento médico) así como los mecanismos moleculares involucrados en el aumento de la prevalencia de diabetes en ACRO deben revisarse cuidadosamente.

Tabla 10 Estudios poblacionales y valor de HOMA según población de referencia:

Estudio	Característica	Valor	Criterio
Hedblad, 2000 ²³⁵	4.816 Suecia, muestra poblacional	≥ 2.0	Percentil 75
Summer, 2008 ²³⁶	N = 2804, población de EEUU. NHANES, edad ≥ 20 años, IMC y GB normal	≥ 2.73	Percentil 66
Geloneze, 2006 ²³⁷	1317 brasileños, edad: 40 ± 12 años, IMC: 34 ± 10 kg / m ²	≥ 2.77	Percentil 90
Esteghamati, 2009 ²³⁸	N = 1,276 iraní, Edad: 38 ± 12 años, no diabético, normotenso	$\geq 1,95$	ROC
Marques-Vidal, 2002 ²³⁴	N=1153 Francia, edad: 35–64 años, muestra basada en la población.	≥ 3.8	Percentil 75
Miccoli, 2005 ²³⁹	N= 225 Italia, edad: 40–79 años, sujetos sanos	≥ 2.77	Percentil 80
Ascaso, 2001 ²⁴⁰	N 292 no diabéticos España (Valencia)	$\geq 3,4$ H 3,6 (1,6) M 3,3 (1,8)	Fórmula
Tomé, 2009 ²⁴¹	N = 2860 España, población basada: 18–104 años, IMC: 26.2 ± 4.9 kg / m ²	= 2	ROC

Tabla 11: Resumen de estudios en pacientes con acromegalia, en los que se dispone de HOMA o se puede calcular

Estudio	Origen	Valor del HOMA
Colao et al , 2009 ²⁴²	Italia 112 ACRO sin tratamiento y post-SAs	HOMA-IR basal Total 4.0 HOMA-IR post SAs 1.5
Kinoshita et al, 2011 ²⁴³	Japón 92 ACRO activos sin tratamiento	HOMA-IR NGT 1.3 ± 0.6 IGT 1.7 ± 1.2 DM2 1.4 ± 1.1
Lin et al, 2012 ²⁴⁴	EEUU Boston (n = 76) (Activos: n = 20)	HOMA-IR Activos: 3.83 ± 0.32
Urbani et al, 2013 ²⁴⁵	Italia 50 ACRO + SAs	HOMA2-IR basal SAs-controlado 1.42±0.34 SAs-no controlado 1.93±0.35 p 0.3002
Ciresi et al, 2013 ²⁴⁶	Italia 307 ACRO activa sin tratamiento	Homa-IR Total 4.33 ± 2.66 H: 3.59 ± 2.24 M: 5.08 ± 2.84
Niculescu et al, 2013 ²⁴⁷	Rumania 114 ACRO 55 sin tratamiento 59 post iq o RT	HOMA-IR Total 4,6 (2.7-7.6) Glucosa Normal 3,7 (2.4-6.0) Hiperglucemicos 6.0 (4.0-10.0)
Reid. et al, 2015 ²⁴⁸	América 138 ACRO post IQ sin tratamiento médico	HOMA-IR Curados 1.73 ± 1.3 Activos 3.14 ± 2.6
Edo et al. 2016 ²⁴⁹	Japón 110 ACRO sin tto y post iq	HOMA-IR basal GH<0.4: 2.40 ± 1.74 (0.14–9.94) GH>0.4: 1.51 ± 0.64 (0.74–2.72) HOMA-IR post iq GH<0.4: 1.05 ± 0.48 (0.21–2.99) GH>0.4: 0.76 ± 0.19 (0.40–1.01)
Olarescu et al, 2016 ¹⁰⁵	Noruega 70 ACRO activo sin tratamiento	HOMA_IR Total 3.2 Baja grasa visceral 2.6 Alta grasa visceral 3.8
Shen et al, 2018 ²⁵⁰	China 64 ACRO	HOMA-IR PRE 4.27 Post IQ 1.36
Briet et al 2018 ²³²	Francia 92 ACRO	HOMA-IR BASAL y post tratamiento Basal 2.25 (1.0–3.5) Post-tratamiento 0.88 (0.7–1.3)
He W. et al 2019 ²⁵¹	China 151 ACRO	HOMA-IR BASAL Todos 3.6 (2.33–6.21) NGT 2.79 (2.17–4.07) IGT 4.07 (2.71–6.7) DM 4.13 (2.26–6.76) HOMA-IR post IQ Grupo 1 (curado): 4.04 (2.4–6.37) a 1.36 (0.83–1.99) Grupo 2:(discrepante) 3.45 (2.18–6.8) a 1.49 (1.12–2.25) Grupo 3 (activo): 3.35 (2.4–5.52) a 1.75 (1.1–3.21)

NGT: tolerancia normal a la glucosa IGT: intolerancia a la glucosa, SAs: análogos de somatostatina, iq: cirugía

H: hombre, M: mujer

Nuestros pacientes tampoco presentaron diferencias en el GIMC medida por eco-doppler que es un marcador temprano de riesgo cardiovascular y predictor de ictus e IAM²⁵². En este sentido, los resultados de otros trabajos son discrepantes. Así, algunos autores encuentran mayor grosor^{253,254} otros no encuentran diferencias²⁵⁵ o sólo elevaciones del GIMC en ACRO activa, que se normalizó tras el control de la enfermedad²⁵⁶. En este sentido parece lógico pensar que al estar nuestros pacientes equiparados por FRCV clásicos y en su mayoría ser pacientes con GH e IGF1 en objetivo, estos resultados, son los esperables en nuestra muestra.

Respecto a la presencia de FRCV no clásicos, aparte del comentario efectuado sobre el HOMA-IR, encontramos que el grupo de pacientes con ACRO presentaban niveles más elevados de BNP y mayor depósito de GE.

El BNP se secreta principalmente por los ventrículos del corazón en respuesta a la elongación de la pared ventricular y la expansión del volumen y es buen marcador de riesgo cardiovascular incluso en pacientes sin insuficiencia cardíaca¹⁵³. Sin embargo los resultados en la acromegalia son controvertidos. Arikian S et al.¹⁵⁴ encontraron niveles más elevados de pro-BNP en 22 pacientes recién diagnosticados de ACRO (55.89 ± 46.64 pg/ml en ACRO vs 28.76 ± 22.13 pg/ml en controles), aunque estas diferencias no llegaron a la significación estadística. Tampoco se encontraron diferencias en el estudio de Potter et al.¹⁵⁵ en 12 pacientes con ACRO activa antes y después de 6 meses de tratamiento con octeotrida-LAR. Por el contrario, el grupo de Ito et al.¹⁵⁶ encontró que había una correlación negativa entre los valores de BNP e IGF1 en 19 pacientes con ACRO post cirugía y sin tratamiento anti-hipertensivo. En el estudio de Andreassen et al.¹⁵⁷ los pacientes no tratados con ACRO activa tenían niveles más bajos de pro-BNP y aumentaron cuatro veces después del tratamiento. Estos resultados son similares a los de Verhelst et al.¹⁵⁸, que estudió a 200 pacientes con ACRO equiparados con un grupo de control, y observó concentraciones más bajas de pro-BNP en pacientes con ACRO activa (similar a los controles sanos), pero niveles superiores a lo normal en la enfermedad controlada.

En nuestro estudio los pacientes con ACRO presentaron valores más elevados de BNP 3.12 ± 0.89 vs 2.13 ± 0.87 $p < 0.001$ en comparación con controles, y estas diferencias fueron principalmente en base a un mayor BNP en los pacientes ACRO_CO (es decir bien controlados y bajo tratamiento médico), Estos resultados son similares a los de Verhelst et al.¹⁵⁸ que obtuvieron niveles superiores a lo normal en la enfermedad controlada. El incremento de BNP ejerce un efecto cardioprotector ya que promueve la vasorelajación y la excreción de sodio urinario. En este sentido se podría argumentar que el tratamiento de la acromegalia posibilita el incremento de este péptido cardioprotector que permanece bajo o inapropiadamente normal en la ACRO activa, pero son necesarios más estudios para confirmar este supuesto.

La GE es grasa visceral metabólicamente activa ²⁵⁷. Asimismo, se ha relacionado con el HOMA-IR²¹⁹, síndrome metabólico y riesgo de aterosclerosis ^{163,164}. Sin embargo, su estrecha correlación con la presencia de otros depósitos de grasa hace difícil establecer que sus efectos sean intrínsecos. Se ha comunicado que el espesor de la GE medido por ecocardiográfica es mayor en ACRO que en los controles, independientemente de la actividad de la enfermedad ¹⁶⁶. Sin embargo en otro estudio no se encontraron diferencias cuando la GE se evaluó mediante TAC ¹⁵¹

Dado que la GE es una fuente cercana de ácidos grasos disponible para el consumo miocárdico, es posible que la acumulación de GE pueda estar motivada, al menos en parte, por mecanismos compensatorios o protectores. Por ejemplo, en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tratados con pioglitazona durante 24 semanas, hubo un aumento del volumen de GE en comparación con el grupo de control de pacientes tratados con metformina, con una mejora simultánea de la función diastólica²⁵⁸.

En nuestro estudio la GE fue mayor en pacientes con ACRO en comparación con la población control y no se relacionó con la actividad de la enfermedad. Tampoco observamos relación entre la GE y la presencia de diabetes, HOMA-IR, e IGF1. Es bien sabido que en la acromegalia existen depósitos de grasa ectópica y disfunción de la adiposidad visceral ^{103,104}. Sin embargo, hacen falta estudios específicos dirigidos para averiguar los factores que determinan el acúmulo de GE su relación con la insulín-resistencia y riesgo cardiovascular.

Tal como se ha mencionado en la introducción, la GE deriva embriológicamente del tejido adiposo marrón. En un reciente estudio se ha demostrado que el tejido adiposo marrón promueve la metabolización de BCAAs²⁵⁹ y, por tanto este hallazgo podría en parte explicar la relación inversa que hemos detectado entre grasa epicárdica y BCAAs en nuestro estudio.

2. Descenso de BCAAs en la acromegalia: implicaciones clínicas

Hay un total de veinte aminoácidos que conforman la proteína muscular. Nueve de estos son considerados esenciales, lo que significa que no se pueden producir por el organismo en cantidades fisiológicamente significativas, por lo que se han de ingerir con la dieta. La proteína muscular está en constante recambio, con lo cual, la síntesis de proteínas está ocurriendo continuamente para reemplazar la pérdida como consecuencia de su degradación. Los BCAAs, es decir: leucina isoleucina y valina, son tres de esos nueve aminoácidos esenciales, necesarios para la síntesis de otros aminoácidos y también tienen un papel regulador de la síntesis proteica²⁶⁰. Los BCAAs presentan una particularidad respecto a otros aminoácidos y es que su primer paso catabólico no es el hígado sino el musculo y tejido adiposo; el hígado carece de la enzima necesaria para realizar el primer paso catabólico. Así pues, los BCAAs son especialmente interesantes por depender del

consumo exógeno, se catabolizan en el músculo y tejido adiposo (órganos diana de la GH) y tienen un papel importante en la regulación de la síntesis proteica. Así mismo tienen un papel en la regulación de la secreción de insulina, intervienen en la gluconeogénesis y en el consumo del cerebro de aminoácidos y formación de neurotransmisores²⁶¹.

El incremento de BCAAs se ha relacionado con obesidad, resistencia a la inulina y riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 ^{262,204,263,205,264,265}. De hecho, en estudios poblacionales previos, los riesgos relativos asociados con los BCAAs fueron comparables o mayores que los asociados con una mayor edad, hiperglucemia en ayunas o índice de masa corporal elevado ²⁶⁶. Algunos de estos estudios que relacionan BCAAs y resistencia a la insulina, han empleado técnicas metabólicas no dirigidas ²⁶³. En el estudio PREDIMED²⁰⁵ se demostró que tanto el incremento basal de BCAAs como el aumento a lo largo de un año tras seguir una dieta se asociaba con mayor riesgo de desarrollar diabetes. Newgard et al.¹⁹⁸, estudiaron la huella metabólica de pacientes obesos sin diabetes comparado con controles delgados y encontraron que los obesos tenían niveles más bajos de GH, IGF-1, IGFBP-1 y IGFBP-2, y que había un grupo dentro de los obesos que tenían mayor IR y aumento de ciertos aminoácidos, en especial los BCAAs. Los autores sugirieron que, en el contexto de la sobrenutrición y bajos niveles de IGF-1, el exceso de BCAAs de la dieta estimularía en el músculo esquelético la vía mTOR/S6K que fosforila IRS1 lo cual resulta en insulín-resistencia ^{198,267,268,204} Para una descripción más detallada de estos mecanismos se puede consultar la excelente revisión de Gancheva et al.²⁶⁵

Dado que la ACRO se ha asociado clásicamente con IR, nuestros resultados, es decir objetivar un descenso de los BCAAs en la ACRO, parece contradecir estos estudios anteriores. Sin embargo, en nuestra serie no encontramos diferencias en el HOMA-IR entre los sujetos del grupo control y dentro del grupo ACRO, el HOMA-IR fue similar entre los pacientes con ACRO activo y controlado. Además, no encontramos ninguna relación entre HOMA-IR y los BCAA circulantes. Por lo tanto, la huella metabólica observada en pacientes con ACRO no parece estar relacionada con la IR.

La razón por la que el aumento de GH/IGF-1 induce una disminución de los BCAA circulantes parece estar relacionada con una mayor captación de estos aminoácidos por parte del músculo, favoreciendo así una acción anabólica. Los primeros estudios que mostraron el efecto de la GH en la proteína muscular se midieron mediante una técnica de dilución de isótopos que, de hecho, evaluó la tasa de desaparición de BCAA (un índice de síntesis de proteínas) ^{76,81,84,79,87}. (**Tabla 1**). Estos trabajos mostraron consistentemente una reducción de BCAA después de la administración de GH y confirmaron que la acción muscular de la GH es principalmente anabólica, con poco efecto sobre la proteólisis. Más recientemente, Sawa et al.²⁶⁹ en ratas deficitarias de GH mostraron que la administración de GH mejora el transporte de BCAA en el miocito al aumentar el transportador de aminoácidos de tipo L (LAT1). Por otra parte, la administración de GH a vacas lecheras²⁷⁰ aumentó la producción de leche y, tanto en plasma como en tejido mamario, los niveles de BCAA se redujeron

significativamente. Finalmente, dado que la GH dificulta el empleo de la glucosa como sustrato, favoreciendo el empleo de lípidos⁵³, es necesaria la gluconeogénesis hepática y renal para la obtención de energía. Los sustratos gluconeogénicos incluyen glicerol, lactato, propionato y aminoácidos glucogénicos como la valina y la isoleucina. Nuestros hallazgos muestran niveles más bajos de lactato, valina e isoleucina en pacientes con ACRO respecto a controles, por lo que sugerirían la activación de esta vía. Una vez más, GH en lugar de IGF-1 parece ser clave en estos cambios metabólicos.

Aunque el incremento basal en los BCAA se ha relacionado con el aumento del riesgo cardiovascular (CV)^{147,271, 272}. El estudio PREDIMED-CV²⁷³ no pudo demostrar que la corrección de los niveles de BCAA conllevara disminución del riesgo CV tras una año de dieta rica en aceite de oliva, pero sí demostró que la disminución de BCAA reducía el riesgo de desarrollar diabetes²⁰⁵. Así pues los niveles elevados de BCAA pueden promover IR que conlleva incremento del riesgo CV, pero también podrían ser sólo un mero biomarcador más que un evento iniciador causal^{265,274}.

Los estudios actuales sugieren que el aumento de la circulación de BCAA está relacionado en parte con la obesidad y una disminución en el catabolismo de los mismos en el tejido adiposo²⁷⁵. El catabolismo defectuoso de BCAA conduciría a una acumulación de BCAA y sus productos intermedios, induciendo estrés oxidativo²⁷⁶. Específicamente, la leucina podría tener un papel en la inhibición de la síntesis de ON en las células endoteliales, lo cual conllevaría disfunción endotelial²⁷⁷. Por otra parte se cree que, el aumento en concentraciones de BCAA puede conducir a activar mTOR y, en consecuencia, inducir alteraciones en el recambio proteico, lípido / glucosa / metabolismo de nucleótidos, y alterar la apoptosis cardíaca haciendo al miocardio más proclive a la isquemia^{273,276}. Finalmente, el trabajo reciente de Li et al,²⁷⁸ demuestra en ratones que la acumulación crónica de BCAAs en miocardio lo vuelve vulnerable a la isquemia.

La disminución de los niveles séricos de BCAA que se produce en la ACRO activa podría tener dos consecuencias principales con un significado opuesto. Primero, los niveles bajos de BCAA podrían ser un factor contribuyente de la miopatía que presentan los pacientes acromegálicos y que ha sido ampliamente reportada^{137,279,138}. Segundo, los niveles bajos de BCAA podrían actuar como factor protector de la enfermedad isquémica coronaria^{278,280}. En este sentido, se debe tener en cuenta que aunque la enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de mortalidad prematura en pacientes con ACRO, esto no se debe en general a mayor número de eventos isquémicos³⁻⁶. De hecho, los pacientes acromegálicos presentan una baja incidencia de enfermedad isquémica cardíaca a pesar del aumento de los factores de riesgo cardiovascular como diabetes y HTA^{14,147,148,151,281}. Li et al.²⁷⁸ han comunicado recientemente que el catabolismo defectuoso de BCAA y la acumulación crónica de BCAAs suprimen el metabolismo de la glucosa y exacerbaban la lesión por isquemia-reperusión. Por contra, también se ha propuesto el papel de los metabolitos de BCAAs en la cardioprotección contra la lesión aguda por isquemia / reperusión²⁸². Por lo tanto, se necesitan estudios específicos dirigidos a

desentrañar las consecuencias tanto a nivel del músculo esquelético como a nivel cardiovascular de los bajos niveles circulantes de BCAA que se producen en pacientes con ACRO.

En el caso de que estudios con cohortes más amplias confirmen que la huella metabólica en la acromegalia es el descenso de BCAA, podría abrirse una nueva línea terapéutica. En este sentido, se podría valorar la suplementación de estos BCAA deficitarios, como un tratamiento coadyuvante de pacientes con ACRO destinado, entre otros, a aumentar la fuerza muscular, incluida la contractilidad cardíaca. De hecho, la suplementación con BCAA en la dieta puede mitigar el dolor muscular después de un ejercicio intenso^{283,284} y también previene la sarcopenia en pacientes con cirrosis hepática^{285,286}. Además, estudios experimentales han demostrado recientemente que los BCAA son esenciales para mantener las proteínas miofibrilares²⁸⁷ y la regulación del catabolismo de los BCAA en los músculos es importante para la homeostasis del metabolismo de la energía muscular y, al menos en parte, para la adaptación al ejercicio²⁸⁸. Sin embargo, se necesitan estudios dirigidos a aclarar esta importante cuestión en el contexto de la acromegalia.

3. Limitaciones del estudio

Nuestro estudio tiene varias limitaciones. Primero, el número de pacientes incluidos hace que nuestros resultados deban reproducirse en otras cohortes más grandes. En segundo lugar, la huella metabólica podría estar enmascarada por el tratamiento recibido por los pacientes con ACRO. Sin embargo, la relación entre los niveles de GH y BCAA de forma consistente va en contra de esta posibilidad. Finalmente, los pacientes no siguieron una dieta estandarizada antes de obtener las muestras para el análisis metabolómico, lo que podría aumentar la variabilidad de los resultados. Sin embargo, hemos podido detectar de forma consistente diferencias significativas en los BCAA al comparar sujetos ACRO versus control y entre la acromegalia activa y la acromegalia controlada bajo tratamiento médico, por lo que el impacto de esta limitación es probablemente poco relevante.

VII. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La principal huella metabólica que distingue a los pacientes acromegálicos de la población control equiparada por edad, sexo y factores clásicos de riesgo cardiovascular, es la reducción de los niveles plasmáticos de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs: isoleucina y valina).
2. Esta huella metabólica se relaciona con el grado de actividad de la enfermedad. Así, los pacientes con acromegalia activa presentaban niveles más reducidos de BCAAs que los pacientes que estaban controlados mediante tratamiento o en remisión de la enfermedad.
3. La reducción de los niveles circulantes de BCAAs se relacionan con los niveles de GH y no de IGF-1, lo que sugiere que el principal mediador de la huella metabólica es GH y no IGF-1.
4. No se detectó relación entre la huella metabólica y los factores de riesgo cardiovascular clásicos ni con la resistencia a la insulina, pero sí con los depósitos de grasa epicárdica.

VIII. LÍNEAS DE FUTURO

VII. LÍNEAS DE FUTURO

Nuestros resultados abren nuevos campos que inciden de pleno en la denominada investigación traslacional. A continuación, se mencionan los que creemos más relevantes:

1. La confirmación del hecho de que los BCAAs circulantes están disminuidos en los pacientes acromegálicos, y en especial en aquellos con acromegalia activa, puede ser útil para mejorar el rendimiento de la IGF-1 en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. En este sentido, dado que la disminución de BCAAs se relaciona con la GH y no con los niveles de IGF-1, la determinación de BCAAs permitiría extraer información complementaria de la acción metabólica de la GH y diferenciar en cierto modo diferentes fenotipos de la enfermedad. Evidentemente, para explorar esta hipótesis estamos en disposición de realizar un estudio prospectivo que idealmente debería ser multicéntrico.

2. Dada la importancia de los BCAAs como elementos deletéreos para la isquemia miocárdica, su reducción mediada por GH podría tener un efecto protector que podría explicar el porqué los pacientes acromegálicos presentan menor tasa de eventos isquémicos a nivel coronario. Este podría ser uno de los objetivos del estudio prospectivo arriba mencionado.

3. Los niveles disminuidos de BCAAs pueden ser un elemento patogénico esencial en la miopatía que presentan los pacientes acromegálicos. A fin de evaluar esta hipótesis nos planteamos realizar a corto plazo un estudio experimental y un ensayo clínico en dos fases.

El estudio experimental contará de experimentos *in vitro* en el utilizaremos miocitos (línea C2C12) cultivados en medios enriquecidos con BCAAs que serán tratados con GH, IGF-1 y vehículo. La hipótesis es que en los cultivos tratados con GH detectaremos menos BCAAs en el sobrenadante ya que serán captados por la célula muscular. También se realizará un estudio *in vivo* en el que se utilizarán ratones SIRKO/SIGFRKO (modelo que simula una acromegalia en tratamiento) a fin de reproducir lo que hemos encontrado en humanos. En caso afirmativo dispondríamos de un modelo que sería ideal para realizar diferentes estudios mecanísticos y de intervención.

El estudio clínico que tenemos planeado implementar se fundamenta en que la suplementación dietética con BCAAs en los pacientes acromegálicos mejorara el funcionalismo y la fuerza muscular. Primero realizaremos un estudio piloto y si se cumple la hipótesis realizaríamos un estudio más amplio que podría integrarse en el ensayo clínico prospectivo mencionado en los puntos 1 y 2.

IX. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Bengtsson BA, Edén S, Ernest I, Odén A, Sjögren B. Epidemiology and long-term survival in acromegaly. A study of 166 cases diagnosed between 1955 and 1984. *Acta Med Scand.* 1988;223(4):327–35.
2. Dal J, Feldt-Rasmussen U, Andersen M, Kristensen LØ, Laurberg P, Pedersen L, et al. Acromegaly incidence, prevalence, complications and long-term prognosis: a nationwide cohort study. *Eur J Endocrinol.* 2016 Sep 1;175(3):181–90.
3. Arosio M, Reimondo G, Malchiodi E, Berchiolla P, Borraccino A, Marinis LD, et al. Predictors of morbidity and mortality in acromegaly: an Italian survey. *Eur J Endocrinol.* 2012 Jan 8;167(2):189–98.
4. Ritvonen E, Löyttyniemi E, Jaatinen P, Ebeling T, Moilanen L, Nuutila P, et al. Mortality in acromegaly: a 20-year follow-up study. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(6):469–80.
5. Varadhan L, Reulen RC, Brown M, Clayton RN. The role of cumulative growth hormone exposure in determining mortality and morbidity in acromegaly: a single centre study. *Pituitary.* 2016 Jun;19(3):251–61.
6. Esposito D, Ragnarsson O, Granfeldt D, Marlow T, Johannsson G, Olsson DS. Decreasing mortality and changes in treatment patterns in patients with acromegaly from a nationwide study. *Eur J Endocrinol.* 2018 May;178(5):459–69.
7. Giustina A, Barkan A, Beckers A, Biermasz N, Biller BMK, Boguszewski C, et al. A Consensus on the Diagnosis and Treatment of Acromegaly Comorbidities: An Update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 Oct 13;
8. Mercado M, Gonzalez B, Vargas G, Ramirez C, de los Monteros ALE, Sosa E, et al. Successful mortality reduction and control of comorbidities in patients with acromegaly followed at a highly specialized multidisciplinary clinic. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Dec;99(12):4438–46.
9. Sardella C, Cappellani D, Urbani C, Manetti L, Marconcini G, Tomisti L, et al. Disease activity and lifestyle influence comorbidities and cardiovascular events in patients with acromegaly. *Eur J Endocrinol.* 2016 Nov;175(5):443–53.
10. Rajasoorya C, Holdaway IM, Wrightson P, Scott DJ, Ibbertson HK. Determinants of clinical outcome and survival in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994 Jul;41(1):95–102.
11. Orme SM, McNally RJ, Cartwright RA, Belchetz PE. Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. United Kingdom Acromegaly Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Aug;83(8):2730–4.
12. Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD. Factors influencing mortality in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):667–74.
13. Lu C, Schwartzbauer G, Sperling MA, Devaskar SU, Thamocharan S, Robbins PD, et al. Demonstration of direct effects of growth hormone on neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22;276(25):22892–900.
14. Isgaard J, Arcopinto M, Karason K, Cittadini A. GH and the cardiovascular system: an update on a topic at heart. *Endocrine.* 2015;48(1):25–35.
15. Webb SM. Quality of life in acromegaly. *Neuroendocrinology.* 2006;83(3–4):224–9.
16. Li CH, Evans HM. THE ISOLATION OF PITUITARY GROWTH HORMONE. *Science.* 1944 Mar 3;99(2566):183–4.
17. Peñalva A, Burguera B, Casabiell X, Tresguerres JA, Dieguez C, Casanueva FF. Activation of cholinergic neurotransmission by pyridostigmine reverses the inhibitory effect of hyperglycemia on growth hormone (GH) releasing hormone-induced GH secretion in man: does acute hyperglycemia act through hypothalamic release of somatostatin? *Neuroendocrinology.* 1989 May;49(5):551–4.
18. Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science.* 1981 Jun 12;212(4500):1279–81.
19. Yamashita S, Melmed S. Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: suppression of growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology.* 1986 Jan;118(1):176–82.

20. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):656–60.
21. Roth J, Glick SM, Yalow RS, Bersonsa null. Hypoglycemia: a potent stimulus to secretion of growth hormone. *Science*. 1963 May 31;140(3570):987–8.
22. Sukkar MY, Hunter WM, Passmore R. Changes in plasma levels of insulin and growth-hormone levels after a protein meal. *Lancet Lond Engl*. 1967 Nov 11;2(7524):1020–2.
23. Szego CM, White A. The influence of purified growth hormone on fasting metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1948 Jul;8(7):594.
24. Binder G, Donner J, Becker B, Bauer JL, Schweizer R. Changes in body composition in male adolescents with childhood-onset GH deficiency during transition. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019 May 22;
25. Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol*. 2010 Jun;205(3):201–10.
26. Colao A, Vitale G, Pivonello R, Ciccarelli A, Somma CD, Lombardi G. The heart: an end-organ of GH action. *Eur J Endocrinol*. 2004 Jan 8;151(Suppl 1):S93-101.
27. Burman P, Dekkers OM. A permissive role of growth hormone (GH) in the development of second brain tumors after radiotherapy? *Endocrine*. 2017 Aug;57(2):356–8.
28. Lea RW, Dawson T, Martinez-Moreno CG, El-Abry N, Harvey S. Growth hormone and cancer: GH production and action in glioma? *Gen Comp Endocrinol*. 2015 Sep 1;220:119–23.
29. LeRoith D, Roberts CT. Insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Aug 27;692:1–9.
30. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, van den Brande JL, van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*. 1972 Jan 14;235(5333):107.
31. Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev*. 2001 Feb;22(1):53–74.
32. Wurzbarger MI, Prelevic GM, Sönksen PH, Balint-Peric LA, Wheeler M. The effect of recombinant human growth hormone on regulation of growth hormone secretion and blood glucose in insulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Jul;77(1):267–72.
33. Powell-Braxton L, Hollingshead P, Giltinan D, Pitts-Meek S, Stewart T. Inactivation of the IGF-I gene in mice results in perinatal lethality. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Aug 27;692:300–1.
34. Pennisi P, Gavrilova O, Setser-Portas J, Jou W, Santopietro S, Clemmons D, et al. Recombinant human insulin-like growth factor-I treatment inhibits gluconeogenesis in a transgenic mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Endocrinology*. 2006 Jun;147(6):2619–30.
35. Simpson HL, Jackson NC, Shojaee-Moradie F, Jones RH, Russell-Jones DL, Sönksen PH, et al. Insulin-like growth factor I has a direct effect on glucose and protein metabolism, but no effect on lipid metabolism in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jan;89(1):425–32.
36. Fain JN. Insulin secretion and action. *Metabolism*. 1984 Jul;33(7):672–9.
37. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev*. 1991 Aug;12(3):235–51.
38. Waters MJ. The growth hormone receptor. *Growth Horm IGF Res*. 2016 Jun;28:6–10.
39. Waters MJ, Hoang HN, Fairlie DP, Pelekanos RA, Brown RJ. New insights into growth hormone action. *J Mol Endocrinol*. 2006 Feb;36(1):1–7.
40. O’Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS, Stephenson SEM, Ward AC. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol*. 2007 Apr;44(10):2497–506.
41. He K, Loesch K, Cowan JW, Li X, Deng L, Wang X, et al. Janus kinase 2 enhances the stability of the mature growth hormone receptor. *Endocrinology*. 2005 Nov;146(11):4755–65.
42. Loesch K, Deng L, Cowan JW, Wang X, He K, Jiang J, et al. Janus kinase 2 influences growth hormone receptor metalloproteolysis. *Endocrinology*. 2006 Jun;147(6):2839–49.
43. Herrington J, Smit LS, Schwartz J, Carter-Su C. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2585–97.
44. Flores-Morales A, Greenhalgh CJ, Norstedt G, Rico-Bautista E. Negative regulation of growth hormone receptor signaling. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2006 Feb;20(2):241–53.
45. Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways. *Arch Physiol Biochem*. 2008 Feb;114(1):17–22.
46. Slaaby R. Specific insulin/IGF1 hybrid receptor activation assay reveals IGF1 as a more potent ligand than insulin. *Sci Rep [Internet]*. 2015 Jan 21 [cited 2018 Sep 4];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4300458/>

47. Kim JJ, Accili D. Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc.* 2002 Apr;12(2):84–90.
48. Louvi A, Accili D, Efstratiadis A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol.* 1997 Sep 1;189(1):33–48.
49. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet.* 1996 Jan;12(1):106–9.
50. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993 Oct 8;75(1):59–72.
51. Taub R. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1996 Mar;10(4):413–27.
52. Jørgensen JOL, Møller L, Krag M, Billestrup N, Christiansen JS. Effects of growth hormone on glucose and fat metabolism in human subjects. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007 Mar;36(1):75–87.
53. Møller N, Jørgensen JOL. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev.* 2009 Apr;30(2):152–77.
54. Neel JV. Diabetes mellitus: a ‘thrifty’ genotype rendered detrimental by ‘progress’? *Am J Hum Genet.* 1962 Dec;14:353–62.
55. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet Lond Engl.* 1963 Apr 13;1(7285):785–9.
56. Rabinowitz D, Zierler KL. A Metabolic Regulating Device based on the Actions of Human Growth Hormone and of Insulin, Singly and Together, on the Human Forearm. *Nature.* 1963 Aug;199(4896):913–5.
57. HOUSSAY BA. The Hypophysis and Metabolism. *N Engl J Med.* 1936 May 14;214(20):961–71.
58. Houssay BA. [Role of the hypophysis in carbohydrate metabolism and diabetes]. *Folia Endocrinol Mens Incretologia E Incretoterapia.* 1950 Apr;3(2):127–36.
59. Beck JC, McGARRY EE, Dyrenfurth I, Venning EH. The metabolic effects of human and monkey growth hormone in man. *Ann Intern Med.* 1958 Nov;49(5):1090–105.
60. Ikkos D, Luft R, Gemzell CA. The effect of human growth hormone in man. *Lancet Lond Engl.* 1958 Apr 5;1(7023):720–1.
61. Raben MS, Hollenberg CH. Effect of growth hormone on plasma fatty acids. *J Clin Invest.* 1959 Mar;38(3):484–8.
62. Fineberg SE, Merimee TJ. Acute metabolic effects of human growth hormone. *Diabetes.* 1974 Jun;23(6):499–504.
63. Rabinowitz D, Klassen GA, Zierler KL. EFFECT OF HUMAN GROWTH HORMONE ON MUSCLE AND ADIPOSE TISSUE METABOLISM IN THE FOREARM OF MAN. *J Clin Invest.* 1965 Jan;44:51–61.
64. Fryburg DA. Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism. *Am J Physiol.* 1994 Aug;267(2 Pt 1):E331–336.
65. Krag MB, Gormsen LC, Guo Z, Christiansen JS, Jensen MD, Nielsen S, et al. Growth hormone-induced insulin resistance is associated with increased intramyocellular triglyceride content but unaltered VLDL-triglyceride kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Mar;292(3):E920–927.
66. Raben MS. Growth hormone. 1. Physiologic aspects. *N Engl J Med.* 1962 Jan 4;266:31–5.
67. Møller N, Jørgensen JO, Alberti KG, Flyvbjerg A, Schmitz O. Short-term effects of growth hormone on fuel oxidation and regional substrate metabolism in normal man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Apr;70(4):1179–86.
68. Frayn KN. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J Appl Physiol.* 1983 Aug;55(2):628–34.
69. Altszuler N, Rathgeb I, Winkler B, De Bodo RC, Steele R. The effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism in the dog. *Ann N Y Acad Sci.* 1968 Feb 5;148(2):441–58.
70. Höybye C, Chandramouli V, Efendic S, Hulting A-L, Landau BR, Schumann WC, et al. Contribution of gluconeogenesis and glycogenolysis to hepatic glucose production in acromegaly before and after pituitary microsurgery. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* 2008 Jul;40(7):498–501.

71. Pontiroli AE, Lanzi R, Monti LD, Pozza G. Effect of acipimox, a lipid lowering drug, on growth hormone (GH) response to GH-releasing hormone in normal subjects. *J Endocrinol Invest.* 1990 Jun;13(6):539–42.
72. Segerlantz M, Brammert M, Manhem P, Laurila E, Groop LC. Inhibition of the rise in FFA by Acipimox partially prevents GH-induced insulin resistance in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Dec;86(12):5813–8.
73. Furling D, Marette A, Puymirat J. Insulin-like growth factor I circumvents defective insulin action in human myotonic dystrophy skeletal muscle cells. *Endocrinology.* 1999 Sep;140(9):4244–50.
74. Moller L, Norrelund H, Jessen N, Flyvbjerg A, Pedersen SB, Gaylinn BD, et al. Impact of growth hormone receptor blockade on substrate metabolism during fasting in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Nov;94(11):4524–32.
75. Higham CE, Rowles S, Russell-Jones D, Umpleby AM, Trainer PJ. Pegvisomant improves insulin sensitivity and reduces overnight free fatty acid concentrations in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jul;94(7):2459–63.
76. Fryburg DA, Gelfand RA, Barrett EJ. Growth hormone acutely stimulates forearm muscle protein synthesis in normal humans. *Am J Physiol.* 1991 Mar;260(3 Pt 1):E499–504.
77. Fryburg DA, Barrett EJ. Growth hormone acutely stimulates skeletal muscle but not whole-body protein synthesis in humans. *Metabolism.* 1993 Sep;42(9):1223–7.
78. Copeland KC, Nair KS. Acute growth hormone effects on amino acid and lipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 May;78(5):1040–7.
79. Horber FF, Haymond MW. Human growth hormone prevents the protein catabolic side effects of prednisone in humans. *J Clin Invest.* 1990 Jul;86(1):265–72.
80. Russell-Jones DL, Weissberger AJ, Bowes SB, Kelly JM, Thomason M, Umpleby AM, et al. The effects of growth hormone on protein metabolism in adult growth hormone deficient patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993 Apr;38(4):427–31.
81. Garibotto G. Muscle amino acid metabolism and the control of muscle protein turnover in patients with chronic renal failure. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 1999 Feb;15(2):145–55.
82. Turkalj I, Keller U, Ninnis R, Vosmeer S, Stauffacher W. Effect of increasing doses of recombinant human insulin-like growth factor-I on glucose, lipid, and leucine metabolism in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Nov;75(5):1186–91.
83. Russell-Jones DL, Umpleby AM, Hennessy TR, Bowes SB, Shojaee-Moradie F, Hopkins KD, et al. Use of a leucine clamp to demonstrate that IGF-I actively stimulates protein synthesis in normal humans. *Am J Physiol.* 1994 Oct;267(4 Pt 1):E591–598.
84. Fryburg DA, Louard RJ, Gerow KE, Gelfand RA, Barrett EJ. Growth hormone stimulates skeletal muscle protein synthesis and antagonizes insulin's antiproteolytic action in humans. *Diabetes.* 1992 Apr;41(4):424–9.
85. Yarasheski KE, Campbell JA, Smith K, Rennie MJ, Holloszy JO, Bier DM. Effect of growth hormone and resistance exercise on muscle growth in young men. *Am J Physiol.* 1992 Mar;262(3 Pt 1):E261–267.
86. Garibotto G, Barreca A, Russo R, Sofia A, Araghi P, Cesarone A, et al. Effects of recombinant human growth hormone on muscle protein turnover in malnourished hemodialysis patients. *J Clin Invest.* 1997 Jan 1;99(1):97–105.
87. Nørrelund H, Nair KS, Jørgensen JOL, Christiansen JS, Møller N. The Protein-Retaining Effects of Growth Hormone During Fasting Involve Inhibition of Muscle-Protein Breakdown. *Diabetes.* 2001 Jan 1;50(1):96–104.
88. Nielsen S, Jørgensen JOL, Hartmund T, Nørrelund H, Nair KS, Christiansen JS, et al. Effects of lowering circulating free fatty acid levels on protein metabolism in adult growth hormone deficient patients. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc.* 2002 Dec;12(6):425–33.
89. Jørgensen JOL, Christiansen JS. *Growth Hormone Deficiency in Adults.* Karger Medical and Scientific Publishers; 2005. 241 p.
90. Møller N, Jørgensen JO, Schmitz O, Møller J, Christiansen J, Alberti KG, et al. Effects of a growth hormone pulse on total and forearm substrate fluxes in humans. *Am J Physiol.* 1990 Jan;258(1 Pt 1):E86–91.
91. Gahete MD, Córdoba-Chacón J, Luque RM, Kineman RD. The rise in growth hormone during starvation does not serve to maintain glucose levels or lean mass but is required for appropriate adipose tissue response in female mice. *Endocrinology.* 2013 Jan;154(1):263–9.

92. Gravhølt CH, Schmitz O, Simonsen L, Bülow J, Christiansen JS, Møller N. Effects of a physiological GH pulse on interstitial glycerol in abdominal and femoral adipose tissue. *Am J Physiol.* 1999;277(5):E848-854.
93. Hansen TK, Gravholt CH, ØRskov H, Rasmussen MH, Christiansen JS, Jørgensen JOL. Dose dependency of the pharmacokinetics and acute lipolytic actions of growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Oct;87(10):4691-8.
94. Cersosimo E, Danou F, Persson M, Miles JM. Effects of pulsatile delivery of basal growth hormone on lipolysis in humans. *Am J Physiol.* 1996 Jul;271(1 Pt 1):E123-126.
95. Møller N, Jørgensen JOL. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev.* 2009 Apr;30(2):152-77.
96. Rosenthal MJ, Woodside WF. Nocturnal regulation of free fatty acids in healthy young and elderly men. *Metabolism.* 1988 Jul;37(7):645-8.
97. Boyle PJ, Avogaro A, Smith L, Bier DM, Pappu AS, Illingworth DR, et al. Role of GH in regulating nocturnal rates of lipolysis and plasma mevalonate levels in normal and diabetic humans. *Am J Physiol.* 1992 Jul;263(1 Pt 1):E168-172.
98. Kousta E, Chrisoulidou A, Lawrence NJ, Anyaoku V, Al-Shoumer KA, Johnston DG. The effects of growth hormone replacement therapy on overnight metabolic fuels in hypopituitary patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 Jan;52(1):17-24.
99. Jørgensen JO, Møller N, Lauritzen T, Alberti KG, Orskov H, Christiansen JS. Evening versus morning injections of growth hormone (GH) in GH-deficient patients: effects on 24-hour patterns of circulating hormones and metabolites. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Jan;70(1):207-14.
100. Beauville M, Harant I, Crampes F, Riviere D, Tauber MT, Tauber JP, et al. Effect of long-term rhGH administration in GH-deficient adults on fat cell epinephrine response. *Am J Physiol.* 1992 Sep;263(3 Pt 1):E467-472.
101. Moore JS, Monson JP, Kaltsas G, Putignano P, Wood PJ, Sheppard MC, et al. Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by growth hormone and insulin-like growth factor: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Nov;84(11):4172-7.
102. Paulsen SK, Pedersen SB, Jørgensen JOL, Fisker S, Christiansen JS, Flyvbjerg A, et al. Growth hormone (GH) substitution in GH-deficient patients inhibits 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 messenger ribonucleic acid expression in adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):1093-8.
103. Freda PU, Shen W, Heymsfield SB, Reyes-Vidal CM, Geer EB, Bruce JN, et al. Lower visceral and subcutaneous but higher intermuscular adipose tissue depots in patients with growth hormone and insulin-like growth factor I excess due to acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jun;93(6):2334-43.
104. Ciresi A, Amato MC, Pizzolanti G, Giordano Galluzzo C. Visceral adiposity index is associated with insulin sensitivity and adipocytokine levels in newly diagnosed acromegalic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Aug;97(8):2907-15.
105. Olarescu NC, Heck A, Godang K, Ueland T, Bollerslev J. The Metabolic Risk in Patients Newly Diagnosed with Acromegaly Is Related to Fat Distribution and Circulating Adipokines and Improves after Treatment. *Neuroendocrinology.* 2016;103(3-4):197-206.
106. Olarescu NC, Bollerslev J. The Impact of Adipose Tissue on Insulin Resistance in Acromegaly. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2016 Apr;27(4):226-37.
107. Sverrisdóttir YB, Elam M, Herlitz H, Bengtsson BA, Johannsson G. Intense sympathetic nerve activity in adults with hypopituitarism and untreated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jun;83(6):1881-5.
108. Isgaard J, Wåhländer H, Adams MA, Friberg P. Increased expression of growth hormone receptor mRNA and insulin-like growth factor-I mRNA in volume-overloaded hearts. *Hypertens Dallas Tex 1979.* 1994 Jun;23(6 Pt 2):884-8.
109. Wickman A, Friberg P, Adams MA, Matejka GL, Brantsing C, Guron G, et al. Induction of growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in aorta and caval vein during hemodynamic challenge. *Hypertens Dallas Tex 1979.* 1997 Jan;29(1 Pt 1):123-30.
110. Guler HP, Zapf J, Scheiwiller E, Froesch ER. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(13):4889-93.

111. Wickman A, Isgaard J, Adams MA, Friberg P. Inhibition of nitric oxide in rats. Regulation of cardiovascular structure and expression of insulin-like growth factor I and its receptor messenger RNA. *J Hypertens*. 1997 Jul;15(7):751–9.
112. D’Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Feb;81(3):935–9.
113. Delafontaine P, Bernstein KE, Alexander RW. Insulin-like growth factor I gene expression in vascular cells. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1991 May;17(5):693–9.
114. Pete G, Hu Y, Walsh M, Sowers J, Dunbar JC. Insulin-like growth factor-I decreases mean blood pressure and selectively increases regional blood flow in normal rats. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1996 Nov;213(2):187–92.
115. Donath MY, Jenni R, Brunner HP, Anrig M, Kohli S, Glatz Y, et al. Cardiovascular and metabolic effects of insulin-like growth factor I at rest and during exercise in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Nov;81(11):4089–94.
116. Donath MY, Sütsch G, Yan XW, Piva B, Brunner HP, Glatz Y, et al. Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Sep;83(9):3177–83.
117. Napoli R, Guardasole V, Angelini V, D’Amico F, Zarra E, Matarazzo M, et al. Acute effects of growth hormone on vascular function in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Jun;88(6):2817–20.
118. Tsukahara H, Gordienko DV, Tonshoff B, Gelato MC, Goligorsky MS. Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int*. 1994 Feb;45(2):598–604.
119. Muniyappa R, Walsh MF, Rangi JS, Zayas RM, Standley PR, Ram JL, et al. Insulin like growth factor I increases vascular smooth muscle nitric oxide production. *Life Sci*. 1997;61(9):925–31.
120. Walsh MF, Barazi M, Pete G, Muniyappa R, Dunbar JC, Sowers JR. Insulin-like growth factor I diminishes in vivo and in vitro vascular contractility: role of vascular nitric oxide. *Endocrinology*. 1996 May;137(5):1798–803.
121. Standley PR, Zhang F, Zayas RM, Muniyappa R, Walsh MF, Cragoe E, et al. IGF-I regulation of Na(+)-K(+)-ATPase in rat arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1997 Jul;273(1 Pt 1):E113-121.
122. Tivesten A, Barlund A, Caidahl K, Klintland N, Cittadini A, Ohlsson C, et al. Growth hormone-induced blood pressure decrease is associated with increased mRNA levels of the vascular smooth muscle KATP channel. *J Endocrinol*. 2004 Oct;183(1):195–202.
123. Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, et al. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med*. 2002 May;8(5):466–72.
124. Sverrisdóttir YB, Elam M, Caidahl K, Söderling A-S, Herlitz H, Johannsson G. The effect of growth hormone (GH) replacement therapy on sympathetic nerve hyperactivity in hypopituitary adults: a double-blind, placebo-controlled, crossover, short-term trial followed by long-term open GH replacement in hypopituitary adults. *J Hypertens*. 2003 Oct;21(10):1905–14.
125. Cordoba-Chacon J, Gahete MD, McGuinness OP, Kineman RD. Differential impact of selective GH deficiency and endogenous GH excess on insulin-mediated actions in muscle and liver of male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Nov 15;307(10):E928-934.
126. Battezzati A, Benedini S, Fattorini A, Losa M, Mortini P, Bertoli S, et al. Insulin action on protein metabolism in acromegalic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Apr;284(4):E823-829.
127. Gibney J, Wolthers T, Burt MG, Leung K-C, Umpleby AM, Ho KKY. Protein metabolism in acromegaly: differential effects of short- and long-term treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Apr;92(4):1479–84.
128. Sönksen PH, Greenwood FC, Ellis JP, Lowy C, Rutherford A, Nabarro JD. Changes of carbohydrate tolerance in acromegaly with progress of the disease and in response to treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 1967 Oct;27(10):1418–30.
129. Fieffe S, Morange I, Petrossians P, Chanson P, Rohmer V, Cortet C, et al. Diabetes in acromegaly, prevalence, risk factors, and evolution: data from the French Acromegaly Registry. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*. 2011 Jun;164(6):877–84.
130. Jørgensen JOL, Krag M, Jessen N, Nørrelund H, Vestergaard ET, Møller N, et al. Growth hormone and glucose homeostasis. *Horm Res*. 2004;62 Suppl 3:51–5.

131. Puder JJ, Nilavar S, Post KD, Freda PU. Relationship between disease-related morbidity and biochemical markers of activity in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Apr;90(4):1972–8.
132. Dekkers OM, Biermasz NR, Pereira AM, Romijn JA, Vandenbroucke JP. Mortality in acromegaly: a metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jan;93(1):61–7.
133. Pivonello R, Auriemma RS, Grasso LFS, Pivonello C, Simeoli C, Patalano R, et al. Complications of acromegaly: cardiovascular, respiratory and metabolic comorbidities. *Pituitary.* 2017 Feb 1;20(1):46–62.
134. Arosio M, Reimondo G, Malchiodi E, Berchiolla P, Borraccino A, De Marinis L, et al. Predictors of morbidity and mortality in acromegaly: an Italian survey. *Eur J Endocrinol.* 2012 Aug;167(2):189–98.
135. Gatto F, Campana C, Cocchiara F, Corica G, Albertelli M, Boschetti M, et al. Current perspectives on the impact of clinical disease and biochemical control on comorbidities and quality of life in acromegaly. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019 Jul 24;
136. Woodmansee WW, Gordon MB, Molitch ME, Ioachimescu AG, Carver DW, Mirakhur B, et al. Screening for comorbid conditions in patients enrolled in the SODA registry: a 2-year observational analysis. *Endocrine.* 2018;61(1):105–17.
137. Miller A, Doll H, David J, Wass J. Impact of musculoskeletal disease on quality of life in long-standing acromegaly. *Eur J Endocrinol.* 2008 May;158(5):587–93.
138. Füchtbauer L, Olsson DS, Bengtsson B-Å, Norrman L-L, Sunnerhagen KS, Johannsson G. Muscle strength in patients with acromegaly at diagnosis and during long-term follow-up. *Eur J Endocrinol.* 2017 Aug;177(2):217–26.
139. Nagulesparen M, Trickey R, Davies MJ, Jenkins JS. Muscle changes in acromegaly. *BMJ.* 1976 Oct 16;2(6041):914–5.
140. Killinger Z, Payer J, Lazúrová I, Imrich R, Homérová Z, Kužma M, et al. Arthropathy in acromegaly. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010 Nov;36(4):713–20.
141. Melmed S, Casanueva FF, Klibanski A, Bronstein MD, Chanson P, Lamberts SW, et al. A consensus on the diagnosis and treatment of acromegaly complications. *Pituitary.* 2013 Sep;16(3):294–302.
142. Saccà L, Cittadini A, Fazio S. Growth hormone and the heart. *Endocr Rev.* 1994 Oct;15(5):555–73.
143. Vitale G, Pivonello R, Auriemma RS, Guerra E, Milone F, Savastano S, et al. Hypertension in acromegaly and in the normal population: prevalence and determinants. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Oct;63(4):470–6.
144. Mosca S, Paolillo S, Colao A, Bossone E, Cittadini A, Iudice FL, et al. Cardiovascular involvement in patients affected by acromegaly: An appraisal. *Int J Cardiol.* 2012 Dec 4;
145. Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer AM. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 15;92(17):8031–5.
146. Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, Liu Y, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 1997 Oct 15;100(8):1991–9.
147. Bogazzi F, Battolla L, Spinelli C, Rossi G, Gavioli S, Bello VD, et al. Risk Factors for Development of Coronary Heart Disease in Patients with Acromegaly: A Five-Year Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jan 11;92(11):4271–7.
148. Cannavo S, Almoto B, Cavalli G, Squadrito S, Romanello G, Vigo MT, et al. Acromegaly and Coronary Disease: An Integrated Evaluation of Conventional Coronary Risk Factors and Coronary Calcifications Detected by Computed Tomography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jan 10;91(10):3766–72.
149. Akutsu H, Kreutzer J, Wasmeier G, Ropers D, Rost C, Möhlig M, et al. Acromegaly per se does not increase the risk for coronary artery disease. *Eur J Endocrinol.* 2010 Jan 5;162(5):879–86.
150. Isgaard J, Arcopinto M, Karason K, Cittadini A. GH and the cardiovascular system: an update on a topic at heart. *Endocrine.* 2015 Feb;48(1):25–35.
151. Aulinas A, Crespo I, Viladés D, Leta R, Urgell E, Biagetti B, et al. Cystatin-C and epicardial adipose tissue as noninvasive predictors of cardiovascular risk in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2017 Feb;86(2):214–22.

152. Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail.* 2004 Mar 15;6(3):257–60.
153. Sweeney C, Ryan F, Ledwidge M, Ryan C, McDonald K, Watson C, et al. Natriuretic peptide-guided treatment for the prevention of cardiovascular events in patients without heart failure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Oct 15;10:CD013015.
154. Arikan S, Bahceci M, Tuzcu A, Gokalp D. N-terminal pro-brain natriuretic peptide in newly diagnosed acromegaly. *J Endocrinol Invest.* 2010 Sep;33(8):571–5.
155. Potter BJ, Beauregard C, Serri O. Serum markers of cardiovascular risk in patients with acromegaly before and after six months of treatment with octreotide LAR. *Pituitary.* 2008;11(1):49–53.
156. Ito M, Kodama M, Tsumanuma I, Ramadan MM, Hirayama S, Kamimura T, et al. Relationship Between Insulin-Like Growth Factor-I and Brain Natriuretic Peptide in Patients With Acromegaly After Surgery. *Circ J.* 2007;71(12):1955–7.
157. Andreassen M, Faber J, Vestergaard H, Kistorp C, Kristensen LØ. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with growth hormone disturbances. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66(5):619–25.
158. Verhelst J, Velkeniers B, Maiter D, Haentjens P, T'Sjoen G, Rietzschel E, et al. Active acromegaly is associated with decreased hs-CRP and NT-proBNP serum levels: insights from the Belgian registry of acromegaly. *Eur J Endocrinol.* 2013 Feb;168(2):177–84.
159. Iacobellis G, Corradi D, Sharma AM. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2005 Oct;2(10):536–43.
160. Iacobellis G, Barbaro G. The double role of epicardial adipose tissue as pro- and anti-inflammatory organ. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* 2008 Jul;40(7):442–5.
161. Iacobellis G. Echocardiographic epicardial fat: A new tool in the white coat pocket. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008 Oct 1;18(8):519–22.
162. Mazurek Tomasz, Zhang LiFeng, Zalewski Andrew, Mannion John D., Diehl James T., Arafat Hwya, et al. Human Epicardial Adipose Tissue Is a Source of Inflammatory Mediators. *Circulation.* 2003 Nov 18;108(20):2460–6.
163. Iacobellis G. Local and systemic effects of the multifaceted epicardial adipose tissue depot. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Jun;11(6):363–71.
164. Iacobellis G. Epicardial adipose tissue in endocrine and metabolic diseases. *Endocrine.* 2014 May;46(1):8–15.
165. Chaowalit N, Lopez-Jimenez F. Epicardial adipose tissue: friendly companion or hazardous neighbour for adjacent coronary arteries? *Eur Heart J.* 2008 Mar 1;29(6):695–7.
166. Topaloglu O, Sayki Arslan M, Turak O, Ginis Z, Sahin M, Cebeci M, et al. Three noninvasive methods in the evaluation of subclinical cardiovascular disease in patients with acromegaly: epicardial fat thickness, aortic stiffness and serum cell adhesion molecules. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014 May 1;80(5):726–34.
167. Tokarz J, Haid M, Cecil A, Prehn C, Artati A, Möller G, et al. Endocrinology Meets Metabolomics: Achievements, Pitfalls, and Challenges. *Trends Endocrinol Metab.* 2017 Oct;28(10):705–21.
168. Rauh M. Steroid measurement with LC-MS/MS in pediatric endocrinology. *Mol Cell Endocrinol.* 2009 Mar 25;301(1–2):272–81.
169. Yoon H-R. Screening newborns for metabolic disorders based on targeted metabolomics using tandem mass spectrometry. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2015 Sep;20(3):119–24.
170. Villoria JG, Pajares S, López RM, Marin JL, Ribes A. Neonatal Screening for Inherited Metabolic Diseases in 2016. *Semin Pediatr Neurol.* 2016;23(4):257–72.
171. Ficicioglu C. New tools and approaches to newborn screening: ready to open Pandora's box? *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2017 May;3(3):a001842.
172. Hernandez VV, Barbas C, Dudzik D. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. *ELECTROPHORESIS.* 2017 Sep 1;38(18):2232–41.
173. Naz S, Vallejo M, García A, Barbas C. Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *J Chromatogr A.* 2014 Aug 1;1353:99–105.
174. Engskog MKR, Haglöf J, Arvidsson T, Pettersson C. LC-MS based global metabolite profiling: the necessity of high data quality. *Metabolomics.* 2016 Jul 1;12(7):114.
175. Luque de Castro MD, Priego-Capote F. The analytical process to search for metabolomics biomarkers. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Jan 5;147:341–9.

176. Eisenhofer G, Masjkur J, Peitzsch M, Di Dalmazi G, Bidlingmaier M, Grüber M, et al. Plasma Steroid Metabolome Profiling for Diagnosis and Subtyping Patients with Cushing Syndrome. *Clin Chem*. 2018 Mar;64(3):586–96.
177. Di Dalmazi G, Fanelli F, Mezzullo M, Casadio E, Rinaldi E, Garelli S, et al. Steroid Profiling by LC-MS/MS in Nonsecreting and Subclinical Cortisol-Secreting Adrenocortical Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Sep;100(9):3529–38.
178. Holst JP, Soldin SJ, Tractenberg RE, Guo T, Kundra P, Verbalis JG, et al. Use of steroid profiles in determining the cause of adrenal insufficiency. *Steroids*. 2007 Jan;72(1):71–84.
179. Chang AY, Lalia AZ, Jenkins GD, Dutta T, Carter RE, Singh RJ, et al. Combining a nontargeted and targeted metabolomics approach to identify metabolic pathways significantly altered in polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2017;71:52–63.
180. Xu R, Zhu H, Zhang C, Shen G, Feng J. Metabolomic analysis reveals metabolic characteristics of children with short stature caused by growth hormone deficiency. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2019 Mar 13;
181. Cruz-Topete D, Christensen B, Sackmann-Sala L, Okada S, Jorgensen JOL, Kopchick JJ. Serum proteome changes in acromegalic patients following transsphenoidal surgery: novel biomarkers of disease activity. *Eur J Endocrinol*. 2011 Feb;164(2):157–67.
182. Palau-Rodriguez M, Tulipani S, Marco-Ramell A, Miñarro A, Jauregui O, Gonzalez-Dominguez R, et al. Characterization of Metabolomic Profile Associated with Metabolic Improvement after Bariatric Surgery in Subjects with Morbid Obesity. *J Proteome Res*. 2018 Aug 3;17(8):2704–14.
183. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*. 2003 Nov;49(11):1797–817.
184. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libé R, Hughes BA, et al. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Dec;96(12):3775–84.
185. Wallaschofski H. What will metabolomics studies mean to endocrinology? *J Endocrinol*. 2012 Oct;215(1):1–2.
186. Suhre K. Metabolic profiling in diabetes. *J Endocrinol*. 2014 Jan 6;221(3):R75–85.
187. Haring R. Perspectives for metabolomics in testosterone replacement therapy. *J Endocrinol*. 2012 Oct;215(1):3–16.
188. Boettcher C, Hartmann MF, de Laffolie J, Zimmer K-P, Wudy SA. Absent adrenarche in children with hypopituitarism: a study based on urinary steroid metabolomics. *Horm Res Paediatr*. 2013;79(6):356–60.
189. Varoquaux A, Fur Y le, Imperiale A, Reyre A, Montava M, Fakhry N, et al. Magnetic resonance spectroscopy of paragangliomas: new insights into in vivo metabolomics. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Jan 8;22(4):M1–8.
190. Chen M, Shen M, Li Y, Liu C, Zhou K, Hu W, et al. GC-MS-based metabolomic analysis of human papillary thyroid carcinoma tissue. *Int J Mol Med*. 2015 Dec;36(6):1607–14.
191. Kotłowska A, Puzyn T, Sworzak K, Stepnowski P, Szefer P. Metabolomic Biomarkers in Urine of Cushing's Syndrome Patients. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 29;18(2).
192. Auer MK, Cecil A, Roepke Y, Bultynck C, Pas C, Fuss J, et al. 12-months metabolic changes among gender dysphoric individuals under cross-sex hormone treatment: a targeted metabolomics study. *Sci Rep*. 2016 11;6:37005.
193. Monnerat G, Seara FAC, Evaristo JAM, Carneiro G, Evaristo GPC, Domont G, et al. Aging-related compensated hypogonadism: Role of metabolomic analysis in physiopathological and therapeutic evaluation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018 Jun 18;
194. Samczuk P, Ciborowski M, Kretowski A. Application of Metabolomics to Study Effects of Bariatric Surgery. *J Diabetes Res*. 2018;2018:6270875.
195. Palmer ND, Okut H, Hsu F-C, Ng MCY, Chen Y-DI, Goodarzi MO, et al. Metabolomics Identifies Distinctive Metabolite Signatures for Measures of Glucose Homeostasis: The Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study (IRAS-FS). *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 May 1;103(5):1877–88.
196. Collet T-H, Sonoyama T, Henning E, Keogh JM, Ingram B, Kelway S, et al. A Metabolomic Signature of Acute Caloric Restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017 01;102(12):4486–95.
197. Liu J, Semiz S, van der Lee SJ, van der Spek A, Verhoeven A, van Klinken JB, et al. Metabolomics based markers predict type 2 diabetes in a 14-year follow-up study. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc*. 2017;13(9):104.

198. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* 2009 Apr;9(4):311–26.
199. Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PloS One.* 2010 Dec 10;5(12):e15234.
200. Xie G, Ma X, Zhao A, Wang C, Zhang Y, Nieman D, et al. The metabolite profiles of the obese population are gender-dependent. *J Proteome Res.* 2014 Sep 5;13(9):4062–73.
201. Chen H-H, Tseng YJ, Wang S-Y, Tsai Y-S, Chang C-S, Kuo T-C, et al. The metabolome profiling and pathway analysis in metabolic healthy and abnormal obesity. *Int J Obes* 2005. 2015 Aug;39(8):1241–8.
202. Gao X, Zhang W, Wang Y, Pedram P, Cahill F, Zhai G, et al. Serum metabolic biomarkers distinguish metabolically healthy peripherally obese from unhealthy centrally obese individuals. *Nutr Metab.* 2016 May 12;13(1):33.
203. Adams SH. Emerging perspectives on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state. *Adv Nutr Bethesda Md.* 2011 Nov;2(6):445–56.
204. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med.* 2011 Apr;17(4):448–53.
205. Ruiz-Canela M, Guasch-Ferré M, Toledo E, Clish CB, Razquin C, Liang L, et al. Plasma branched chain/aromatic amino acids, enriched Mediterranean diet and risk of type 2 diabetes: case-cohort study within the PREDIMED Trial. *Diabetologia.* 2018;61(7):1560–71.
206. Zang H, Moritz T, Norstedt G, Hirschberg AL, Tollet-Egnell P. Effects of oestrogen and testosterone therapy on serum metabolites in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012 Aug;77(2):288–95.
207. Boccard J, Badoud F, Jan N, Nicoli R, Schweizer C, Pralong F, et al. Untargeted profiling of urinary steroid metabolites after testosterone ingestion: opening new perspectives for antidoping testing. *Bioanalysis.* 2014;6(19):2523–36.
208. Raro M, Ibáñez M, Gil R, Fabregat A, Tudela E, Deventer K, et al. Untargeted metabolomics in doping control: detection of new markers of testosterone misuse by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Anal Chem.* 2015 Aug 18;87(16):8373–80.
209. Höybye C, Wahlström E, Tollet-Egnell P, Norstedt G. Metabolomics: a tool for the diagnosis of GH deficiency and for monitoring GH replacement? *Endocr Connect.* 2014 Oct 29;3(4):200–6.
210. Katznelson L, Laws ER, Melmed S, Molitch ME, Murad MH, Utz A, et al. Acromegaly: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Nov 1;99(11):3933–51.
211. Douglas PS, Hendel RC, Cummings JE, Dent JM, Hodgson JMcB, Hoffmann U, et al. ACCF/ACR/AHA/ASE/ASNC/HRS/NASCI/RSNA/SAIP/SCAI/SCCT/SCMR 2008 Health Policy Statement on Structured Reporting in Cardiovascular Imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Jan 6;53(1):76–90.
212. Iacobellis G, Willens HJ. Echocardiographic Epicardial Fat: A Review of Research and Clinical Applications. *J Am Soc Echocardiogr.* 2009 Dec 1;22(12):1311–9.
213. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985 Jul;28(7):412–9.
214. Cersosimo E, Solis-Herrera C, Trautmann ME, Malloy J, Triplitt CL. Assessment of Pancreatic β -Cell Function: Review of Methods and Clinical Applications. *Curr Diabetes Rev.* 2014 Jan;10(1):2–42.
215. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004 Jun;27(6):1487–95.
216. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D801-807.
217. Ulrich EL, Akutsu H, Doreleijers JF, Harano Y, Ioannidis YE, Lin J, et al. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D402-408.
218. Berg C, Petersenn S, Lahner H, Herrmann BL, Buchfelder M, Droste M, et al. Cardiovascular risk factors in patients with uncontrolled and long-term acromegaly: comparison with matched data from the general population and the effect of disease control. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Aug;95(8):3648–56.

219. Alexopoulou O, Bex M, Kamenicky P, Mvoula AB, Chanson P, Maiter D. Prevalence and risk factors of impaired glucose tolerance and diabetes mellitus at diagnosis of acromegaly: a study in 148 patients. *Pituitary*. 2014 Feb;17(1):81–9.
220. Vila G, Jørgensen JOL, Luger A, Stalla GK. Insulin Resistance in Patients With Acromegaly. *Front Endocrinol*. 2019;10:509.
221. Petrossians P, Daly AF, Natchev E, Maione L, Blijdorp K, Sahnoun-Fathallah M, et al. Acromegaly at diagnosis in 3173 patients from the Liège Acromegaly Survey (LAS) Database. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(10):505–18.
222. Coculescu M, Niculescu D, Lichiardopol R, Purice M. Insulin resistance and insulin secretion in non-diabetic acromegalic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc*. 2007 May;115(5):308–16.
223. Colao A, Pivonello R, Grasso LFS, Auriemma RS, Galdiero M, Savastano S, et al. Determinants of cardiac disease in newly diagnosed patients with acromegaly: results of a 10 year survey study. *Eur J Endocrinol*. 2011 Nov;165(5):713–21.
224. Kasayama S, Otsuki M, Takagi M, Saito H, Sumitani S, Kouhara H, et al. Impaired beta-cell function in the presence of reduced insulin sensitivity determines glucose tolerance status in acromegalic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000 May;52(5):549–55.
225. Ronchi CL, Orsi E, Giavoli C, Cappiello V, Epaminonda P, Beck-Peccoz P, et al. Evaluation of insulin resistance in acromegalic patients before and after treatment with somatostatin analogues. *J Endocrinol Invest*. 2003 Jun;26(6):533–8.
226. Møller N, Schmitz O, Jørgensen JO, Astrup J, Bak JF, Christensen SE, et al. Basal- and insulin-stimulated substrate metabolism in patients with active acromegaly before and after adenectomy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 May;74(5):1012–9.
227. Cozzolino A, Feola T, Simonelli I, Puliani G, Pozza C, Giannetta E, et al. Somatostatin Analogs and Glucose Metabolism in Acromegaly: A Meta-analysis of Prospective Interventional Studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 Mar 23;
228. Tzanela M, Vassiliadi DA, Gavalas N, Szabo A, Margelou E, Valatsou A, et al. Glucose homeostasis in patients with acromegaly treated with surgery or somatostatin analogues. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Jul 1;75(1):96–102.
229. Mazziotti G, Floriani I, Bonadonna S, Torri V, Chanson P, Giustina A. Effects of somatostatin analogs on glucose homeostasis: a metaanalysis of acromegaly studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 May;94(5):1500–8.
230. Ho KK, Jenkins AB, Furler SM, Borkman M, Chisholm DJ. Impact of octreotide, a long-acting somatostatin analogue, on glucose tolerance and insulin sensitivity in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992 Mar;36(3):271–9.
231. Giustina G, Peracchi M, Reschini E, Panerai E, Pinto M. Dose-response study of the inhibiting effect of somatostatin on growth hormone and insulin secretion in normal subjects and acromegalic patients. *Metabolism*. 1975 Jul;24(7):807–15.
232. Briet C, Ilie MD, Kuhn E, Maione L, Brailly-Tabard S, Salenave S, et al. Changes in metabolic parameters and cardiovascular risk factors after therapeutic control of acromegaly vary with the treatment modality. Data from the Bicêtre cohort, and review of the literature. *Endocrine [Internet]*. 2018 Nov 5 [cited 2018 Nov 10]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1797-8>
233. Briet C, Ilie MD, Kuhn E, Maione L, Brailly-Tabard S, Salenave S, et al. Changes in metabolic parameters and cardiovascular risk factors after therapeutic control of acromegaly vary with the treatment modality. Data from the Bicêtre cohort, and review of the literature. *Endocrine*. 2019 Feb;63(2):348–60.
234. Marques-Vidal P, Mazoyer E, Bongard V, Gourdy P, Ruidavets J-B, Drouet L, et al. Prevalence of insulin resistance syndrome in southwestern France and its relationship with inflammatory and hemostatic markers. *Diabetes Care*. 2002 Aug;25(8):1371–7.
235. Hedblad B, Nilsson P, Janzon L, Berglund G. Relation between insulin resistance and carotid intima-media thickness and stenosis in non-diabetic subjects. Results from a cross-sectional study in Malmö, Sweden. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2000 Apr;17(4):299–307.
236. Sumner AE, Cowie CC. Ethnic differences in the ability of triglyceride levels to identify insulin resistance. *Atherosclerosis*. 2008 Feb;196(2):696–703.
237. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006 May;72(2):219–20.

238. Esteghamati A, Ashraf H, Esteghamati A-R, Meysamie A, Khalilzadeh O, Nakhjavani M, et al. Optimal threshold of homeostasis model assessment for insulin resistance in an Iranian population: the implication of metabolic syndrome to detect insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009 Jun;84(3):279–87.
239. Miccoli R, Bianchi C, Odoguardi L, Penno G, Caricato F, Giovannitti MG, et al. Prevalence of the metabolic syndrome among Italian adults according to ATP III definition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD.* 2005 Aug;15(4):250–4.
240. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. [Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population]. *Med Clin (Barc).* 2001 Nov 3;117(14):530–3.
241. Tomé MA, Botana MA, Cadarso-Suárez C, Rego-Iraeta A, Fernández-Mariño A, Mato JA, et al. Prevalence of metabolic syndrome in Galicia (NW Spain) on four alternative definitions and association with insulin resistance. *J Endocrinol Invest.* 2009 Jun;32(6):505–11.
242. Colao A, Auriemma RS, Savastano S, Galdiero M, Grasso LFS, Lombardi G, et al. Glucose Tolerance and Somatostatin Analog Treatment in Acromegaly: A 12-Month Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 Aug 1;94(8):2907–14.
243. Kinoshita Y, Fujii H, Takeshita A, Taguchi M, Miyakawa M, Oyama K, et al. Impaired glucose metabolism in Japanese patients with acromegaly is restored after successful pituitary surgery if pancreatic β -cell function is preserved. *Eur J Endocrinol.* 2011 Apr 1;164(4):467–73.
244. Lin E, Wexler TL, Nachtigall L, Tritos N, Swearingen B, Hemphill L, et al. Effects of growth hormone deficiency on body composition and biomarkers of cardiovascular risk after definitive therapy for acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;77(3):430–8.
245. Urbani C, Sardella C, Calevro A, Rossi G, Scattina I, Lombardi M, et al. Effects of medical therapies for acromegaly on glucose metabolism. *Eur J Endocrinol.* 2013 Jul 1;169(1):99–108.
246. Ciresi A, Amato MC, Pivonello R, Nazzari E, Grasso LF, Minuto F, et al. The Metabolic Profile in Active Acromegaly is Gender-Specific. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jan 1;98(1):E51–9.
247. Niculescu D, Purice M, Coculescu M. Insulin-like growth factor-I correlates more closely than growth hormone with insulin resistance and glucose intolerance in patients with acromegaly. *Pituitary.* 2013 Jun;16(2):168–74.
248. Reid TJ, Jin Z, Shen W, Reyes-Vidal CM, Fernandez JC, Bruce JN, et al. IGF-1 levels across the spectrum of normal to elevated in acromegaly: relationship to insulin sensitivity, markers of cardiovascular risk and body composition. *Pituitary.* 2015 Apr 24;
249. Edo N, Morita K, Suzuki H, Takeshita A, Miyakawa M, Fukuhara N, et al. Low insulin resistance after surgery predicts poor GH suppression one year after complete resection for acromegaly: a retrospective study. *Endocr J.* 2016;63(5):469–77.
250. Shen M, Wang M, He W, He M, Qiao N, Ma Z, et al. Impact of Long-Acting Somatostatin Analogues on Glucose Metabolism in Acromegaly: A Hospital-Based Study [Internet]. *International Journal of Endocrinology.* 2018 [cited 2019 Mar 19]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ije/2018/3015854/abs/>
251. He W, Yan L, Wang M, Li Q, He M, Ma Z, et al. Surgical outcomes and predictors of glucose metabolism alterations for growth hormone-secreting pituitary adenomas: a hospital-based study of 151 cases. *Endocrine.* 2019;63(1):27–35.
252. Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, et al. Carotid Intima-Media Thickness and Presence or Absence of Plaque Improves Prediction of Coronary Heart Disease Risk: The ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) Study. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Apr 13;55(15):1600–7.
253. Cansu GB, Yılmaz N, Yanıkoğlu A, Özdem S, Yıldırım AB, Süleymanlar G, et al. ASSESSMENT OF DIASTOLIC DYSFUNCTION, ARTERIAL STIFFNESS, AND CAROTID INTIMA-MEDIA THICKNESS IN PATIENTS WITH ACROMEGALY. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol.* 2017 May;23(5):536–45.
254. Ozkan C, Altinova AE, Cerit ET, Yayla C, Sahinarslan A, Sahin D, et al. Markers of early atherosclerosis, oxidative stress and inflammation in patients with acromegaly. *Pituitary.* 2014 Dec 13;
255. Yaron M, Izhakov E, Sack J, Azzam I, Osher E, Tordjman K, et al. Arterial properties in acromegaly: relation to disease activity and associated cardiovascular risk factors. *Pituitary.* 2016 Jun;19(3):322–31.

256. Boysan SN, Kantarci F, Celik O, Mihmanli I, Gazioglu N, Kadioglu P. Atherosclerotic risk factors and premature atherosclerosis in acromegaly before and after 48 months of octreotide-LAR treatment. *Angiology*. 2012 Oct;63(7):522–7.
257. Iacobellis G, Ribaldo MC, Assael F, Vecci E, Tiberti C, Zappaterreno A, et al. Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Nov;88(11):5163–8.
258. Jonker JT, Lamb HJ, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Menting LJ, Diamant M, et al. Pioglitazone Compared with Metformin Increases Pericardial Fat Volume in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jan 1;95(1):456–60.
259. Yoneshiro T, Wang Q, Tajima K, Matsushita M, Maki H, Igarashi K, et al. BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature*. 2019 Aug;572(7771):614–9.
260. Blomstrand E, Eliasson J, Karlsson HKR, Köhnke R. Branched-Chain Amino Acids Activate Key Enzymes in Protein Synthesis after Physical Exercise. *J Nutr*. 2006 Jan 1;136(1):269S–273S.
261. Neinast M, Murashige D, Arany Z. Branched Chain Amino Acids. *Annu Rev Physiol*. 2018 Nov 28;
262. Berger M, Zimmermann-Telschow H, Berchtold P, Drost H, Müller WA, Gries FA, et al. Blood amino acid levels in patients with insulin excess (functioning insulinoma) and insulin deficiency (diabetic ketosis). *Metabolism*. 1978 Jul 1;27(7):793–9.
263. Roberts LD, Koulman A, Griffin JL. Towards metabolic biomarkers of insulin resistance and type 2 diabetes: progress from the metabolome. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 Jan;2(1):65–75.
264. Kahl S, Roden M. Amino acids — lifesaver or killer in patients with diabetes? *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Aug;14(8):449–51.
265. Gancheva S, Jelenik T, Álvarez-Hernández E, Roden M. Interorgan Metabolic Crosstalk in Human Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1371–415.
266. Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, et al. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Nov 20;359(21):2220–32.
267. Krebs M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Meyerspeer M, et al. Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes*. 2002 Mar;51(3):599–605.
268. Krebs M, Roden M. Nutrient-induced insulin resistance in human skeletal muscle. *Curr Med Chem*. 2004 Apr;11(7):901–8.
269. Sawa R, Nishida H, Yamamoto Y, Wake I, Kai N, Kikkawa U, et al. Growth hormone and Insulin-like growth factor-I (IGF-I) modulate the expression of L-type amino acid transporters in the muscles of spontaneous dwarf rats and L6 and C2C12 myocytes. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc*. 2018 Sep 23;42–43:66–73.
270. Sciascia QL, Pacheco D, McCoard SA. Administration of Exogenous Growth Hormone Is Associated with Changes in Plasma and Intracellular Mammary Amino Acid Profiles and Abundance of the Mammary Gland Amino Acid Transporter SLC3A2 in Mid-Lactation Dairy Cows. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134323.
271. Shah SH, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Crosslin DR, Haynes C, et al. Association of a peripheral blood metabolic profile with coronary artery disease and risk of subsequent cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Apr;3(2):207–14.
272. Yang R, Dong J, Zhao H, Li H, Guo H, Wang S, et al. Association of branched-chain amino acids with carotid intima-media thickness and coronary artery disease risk factors. *PLoS One*. 2014;9(6):e99598.
273. Ruiz-Canela M, Toledo E, Clish CB, Hruby A, Liang L, Salas-Salvado J, et al. Plasma Branched-Chain Amino Acids and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial. *Clin Chem*. 2016 Apr 1;62(4):582–92.
274. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Dec;10(12):723–36.
275. Newgard CB. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012 May 2;15(5):606–14.
276. Rajendram R, Preedy VR, Patel V, editors. Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition: Volume 2 [Internet]. Humana Press; 2015 [cited 2018 Oct 1]. (Nutrition and Health). Available from: [//www.springer.com/la/book/9781493919130](http://www.springer.com/la/book/9781493919130)
277. Yang Y, Wu Z, Meininger CJ, Wu G. L-Leucine and NO-mediated cardiovascular function. *Amino Acids*. 2015 Mar;47(3):435–47.

278. Li T, Zhang Z, Kolwicz SC, Abell L, Roe ND, Kim M, et al. Defective Branched-Chain Amino Acid (BCAA) Catabolism Disrupts Glucose Metabolism and Sensitizes the Heart to Ischemia-reperfusion Injury. *Cell Metab.* 2017 Feb 7;25(2):374–85.
279. Lopes AJ, da Silva DPG, Kasuki L, Gadelha MR, Camilo GB, Guimarães FS. Posture and balance control in patients with acromegaly: results of a cross-sectional study. *Gait Posture.* 2014;40(1):154–9.
280. Li R, He H, Fang S, Hua Y, Yang X, Yuan Y, et al. Time Series Characteristics of Serum Branched-Chain Amino Acids for Early Diagnosis of Chronic Heart Failure. *J Proteome Res.* 2019 May 3;18(5):2121–8.
281. Akutsu H, Kreutzer J, Wasmeier G, Ropers D, Rost C, Möhlig M, et al. Acromegaly per se does not increase the risk for coronary artery disease. *Eur J Endocrinol.* 2010 Jan 5;162(5):879–86.
282. Dong W, Zhou M, Dong M, Pan B, Liu Y, Shao J, et al. Keto acid metabolites of branched-chain amino acids inhibit oxidative stress-induced necrosis and attenuate myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2016 Dec;101:90–8.
283. Ra S-G, Miyazaki T, Kojima R, Komine S, Ishikura K, Kawanaka K, et al. Effect of BCAA supplement timing on exercise-induced muscle soreness and damage: a pilot placebo-controlled double-blind study. *J Sports Med Phys Fitness.* 2018 Nov;58(11):1582–91.
284. VanDusseldorp TA, Escobar KA, Johnson KE, Stratton MT, Moriarty T, Cole N, et al. Effect of Branched-Chain Amino Acid Supplementation on Recovery Following Acute Eccentric Exercise. *Nutrients.* 2018 Oct;10(10):1389.
285. Hiraoka A, Michitaka K, Kiguchi D, Izumoto H, Ueki H, Kaneto M, et al. Efficacy of branched-chain amino acid supplementation and walking exercise for preventing sarcopenia in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2017 Dec;29(12):1416–23.
286. Kitajima Y, Takahashi H, Akiyama T, Murayama K, Iwane S, Kuwashiro T, et al. Supplementation with branched-chain amino acids ameliorates hypoalbuminemia, prevents sarcopenia, and reduces fat accumulation in the skeletal muscles of patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol.* 2018 Mar;53(3):427–37.
287. Ishikawa T, Kitaura Y, Kadota Y, Morishita Y, Ota M, Yamanaka F, et al. Muscle-specific deletion of BDK amplifies loss of myofibrillar protein during protein undernutrition. *Sci Rep.* 2017 Jan 4;7:39825.
288. Xu M, Kitaura Y, Ishikawa T, Kadota Y, Terai C, Shindo D, et al. Endurance performance and energy metabolism during exercise in mice with a muscle-specific defect in the control of branched-chain amino acid catabolism. *PloS One.* 2017;12(7):e0180989.