



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ANÁLISIS DE LOS ADENOMAS HIPOFISIARIOS  
MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA Y  
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**B I Ó L O G O**  
P R E S E N T A:  
**JAIRO MARTINEZ MONDRAGON**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ALMA ORTIZ PLATA

ASESORA INTERNA: M en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ



MÉXICO DF. SEPTIEMBRE-2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Alma Ortiz Plata, por haber compartido un poco de sus conocimientos conmigo, por su comprensión y apoyo a lo largo de todo el proyecto.

A la M en IBSH. Angélica Flores Ramírez, por las contribuciones muy valiosas que fueron pilar importante en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado:

M.C. Raúl Zavala Chavero

Dra. Alma Ortiz Plata

M en IBSH. Angélica Flores Ramírez

Dr. José Luís Moran Perales

Biol. Pamela Maria Everardo Arévalo

Por sus observaciones, opiniones y sugerencias, que fueron importantes para enriquecer este trabajo.

Un agradecimiento especial a Aurora Sánchez García, por todo el apoyo proporcionado durante la estancia en el Instituto.

Y finalmente a la comunidad docente de la FES-Zaragoza que tuve la gracia de aprender de ellos y quien contribuyo en mi formación académica, profesional y personal.

Un acrecimiento adicional a todas aquellas personas que encontré en mi camino y que me brindaron la oportunidad para desarrollarme, aprender y tener recursos necesarios para lograr el objetivo, sin duda, de no haber sido por la oportunidad que me brindaron esto no hubiera sido posible.

## *Declaración y Reconocimientos*

*El presente trabajo es una defensa propia contra la insolente y envidiosa imputación de que soy incapaz para un trabajo científico bien elaborado.*

*Existen diferentes personas con diferentes formas que apoyaron y facilitaron la realización de este trabajo entre las que se encuentran mi hermano Gerardo por haber confiado en mí y porque con él he aprendido más de la vida que en cualquier institución educativa*

*A Miriam por el apoyo incondicional que me brinda a lo largo de la carrera y haber hecho que este proyecto que empecé hace un poco más de cinco años fuera más fácil. Éxito en tu nuevo camino, estoy seguro que nuestros senderos se volverán a cruzar.*

*Saludo a Jorge, por una hermandad de más de doce años, un agradecimiento enorme por la muestra, filosofía y material de la escena underground del norte de Europa; gracias hermano (We are a Blaze in the Northern Sky. "The next thousand years are OURS") un abrazo fraternal Emilia, a la pequeña Valeria y al aun más pequeño Diego, larga vida y éxito permanente por el nuevo camino que han decidido juntos seguir. Su crédito correspondiente a Mónica, por haberme ofrecido más de lo merecido y haber perdonado tantas ofensas y equivocaciones provocadas por la desidia e ignorancia, tienes un corazón enorme digno de una dama.*

*A los compañeros de estudio y ahora colegas que de principio a fin han mantenido una camaradería fomentando el apoyo, confianza y amistad. Sarahi, Lupita, Mati, Martha, Antonio y Julio*

*Y finalmente y no por eso menos importantes a todos aquellos quienes me apoyaron y creyeron en mí brindándome su apoyo de la manera más correcta que pueda existir, la propia.*

*También existen personas indignas de agradecimiento, que me obstaculizaron, me hicieron perder el tiempo o simplemente no fue grata su compañía, no es necesario mencionarlos que cada quien sabe de quien se trata, señores nos veremos en la batalla.*

*No Wimps, No Trends, No Posers, No Traitors  
No Fashion, Anti-Mosh*

*En la escuela de guerra de la vida, el que no me mata me hace más fuerte.*

*¡Permaneced fieles a la tierra, hermanos míos, con todo el poder de vuestra virtud! ¡Que sirvan al sentido de la tierra vuestro amor y vuestro conocimiento! Os lo suplico y os lo agradezco. ¡No dejéis volar a vuestra virtud lejos de las cosas terrestres y golpear con sus alas los muros eternos!*  
*¡Ay! ¡Hubo siempre tanta virtud extraviada! ¡Devolved a la tierra, como yo lo hago, la virtud extraviada! ¡Si devolvedla al cuerpo y a la vida a fin de que proporcione a la tierra un sentido, un sentido humano!*

*Todo lo que es profundo ama el disfraz. Todo espíritu profundo tiene  
necesidad de una máscara*

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	i
<b>MARCO TEÓRICO</b>	1
<b>1.- HIPÓFISIS NORMAL</b>	1
<b>2.- EMBRIOLOGÍA</b>	2
<b>3.- RIEGO SANGUÍNEO E INERVACIÓN</b>	5
<b>4.- HISTOLOGÍA</b>	6
4.1.- Células Somatotropas	7
4.2.- Células Lactotropas	7
4.3.- Células Tirotropas	8
4.4.- Células Corticotropas	8
4.5.- Células Gonadotropas	9
4.6.- Células no secretoras	9
<b>5.- HORMONAS DE LA ADENOHIPÓFISIS</b>	10
5.1.- Hormona del crecimiento (GH)	10
5.2.- Prolactina (PRL)	11
5.3.- Hormona Estimulante de la Tiroides o Tirotropina (TSH)	11
5.4.- Hormona Adrenocorticotrópica o Corticotropina (ACTH)	11
5.5.- Gonadotropinas: (hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante [FSH])	13
<b>6.- ADENOMAS HIPOFISIARIOS</b>	14
<b>7.- CLASIFICACIÓN DE LOS ADENOMAS HIPOFISIARIOS</b>	15
7.1.- Adenoma Lactotropo	17
7.2.- Adenoma Somatotropo	18
7.3.- Adenoma Mamosomatotropo	19
7.4.- Adenoma mixto GH/PRL	20
7.5.- Adenomas de célula acidófila madre	20
7.6.- Adenoma Corticotropo	20
7.7.- Adenoma corticotropo silencioso	21
7.8.- Adenoma Gonadotropo	21

7.9.- Adenoma Tirotripo _____	21
7.10.- Adenomas Clínicamente No Funcionales _____	22
7.11.- Adenoma células nulas _____	22
7.12.- Oncocitoma _____	23
7.13.- Adenomas plurihormonales _____	23
<b>8.- MARCADORES BIOLÓGICOS _____</b>	<b>24</b>
8.1.- Ki-67 _____	24
8.2.- PTTG-1 _____	24
8.3.- VEGF _____	25
8.4.- Flk-1 _____	25
8.5.- CD-34 _____	26
<b>9.- TÉCNICAS HISTOPATOLÓGICAS APLICADAS EN EL ANÁLISIS DE LOS ADENOMAS HIPOFISIARIOS _____</b>	<b>26</b>
9.1.- TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA _____	26
9.2.- TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA _____	27
9.3.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA _____	30
<b>JUSTIFICACIÓN _____</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS _____</b>	<b>32</b>
OBJETIVO GENERAL _____	32
OBJETIVOS PARTICULARES _____	32
<b>HIPÓTESIS _____</b>	<b>33</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL _____</b>	<b>34</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS _____</b>	<b>35</b>
<b>INMUNOHISTOQUÍMICA _____</b>	<b>36</b>
<b>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA _____</b>	<b>36</b>
<b>RESULTADOS _____</b>	<b>39</b>
ADENOMAS HIPOFISIARIOS CLINICAMENTE NO FUNCIONANTES _____	39
ADENOMAS HIPOFISIARIOS CLINICAMENTE FUNCIONANTES _____	41
MARCADORES BIOLÓGICOS _____	44
OBSERVACIONES DE ULTRAESTRUCTURA _____	49
MATERIAL RECUPERADO _____	55

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>73</b>

**RESUMEN**

La hipófisis es una glándula endocrina que sintetiza y secreta varias hormonas (prolactina, hormona de crecimiento, hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante, hormona estimulante de la tiroides y hormona adrenocorticotrópica, entre otras). Puede ser afectada por diversas patologías, siendo los adenomas hipofisarios (ADH) la más recurrente y aunque son considerados histológicamente benignos, pueden presentar comportamiento agresivo. Se manifiestan por alteraciones en el equilibrio endocrino y/o por las alteraciones clínicas provocadas por el efecto de masa. En el presente trabajo se estudiaron 37 ADH. Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina-eosina y se procesaron para la técnica de inmunohistoquímica contra las diferentes hormonas adenohipofisarias y marcadores biológicos (ki-67, PTTG-1, VEGF, Flk-1 CD-34). Se realizó un análisis semi-cuantitativo de la actividad hormonal (+= baja; += moderada; +++= alta) y los ADH fueron clasificados de acuerdo a sus manifestaciones clínicas y actividad secretora. Se calculó el índice de marcaje de los marcadores biológicos (porcentaje de células positivas). Otras biopsias fueron rescatadas del bloque de parafina, procesadas para la técnica de microscopía electrónica y observadas en un microscopio electrónico de transmisión. De los 37 ADH, 26 fueron no funcionantes: 19 resultaron positivos para las hormonas gonadotropinas, solas o en combinación con otras hormonas; 2 para prolactina y en 5 no se identificó secreción hormonal; y 11 funcionantes: 7 para GH sola o en combinación con otras hormonas, 1 para ACTH y 3 no secretores. Los índices de los marcadores biológicos fueron mayores para los ADH Clínicamente No funcionantes (CNF). En el análisis de la microscopía electrónica se observaron los marcadores ultraestructurales característicos de los adenomas analizados: complejo de Golgi en panal de abejas para los gonadotrópicos, cuerpos fibrosos citoplásmicos para los GH, abundante retículo endoplásmico para los productores de prolactina, y ases fibrosos en los ACTH. La técnica de recuperación de tejidos de los bloques de parafina mostró ser una opción útil en los casos con escaso tejido y con diagnóstico dudoso.

## MARCO TEÓRICO

### 1.- HIPÓFISIS NORMAL

La hipófisis o pituitaria es una glándula endocrina crucial para el mantenimiento de varias funciones homeostáticas incluyendo el crecimiento, metabolismo y reproducción (Yeung *et al.*, 2006).

Está situada en la base del cerebro, en una porción del esfenoides llamada silla turca (Figura.1). La porción anterior, el tubérculo de la silla turca, esta flanqueada por porciones posteriores de las alas del esfenoides, la apófisis clinoides posterior. La glándula esta rodeada por la duramadre y el techo se forma por un plegamiento de la duramadre unido a las apófisis clinoides llamado diafragma de la silla, la cual evita que la membrana aracnoides y el líquido cefalorraquídeo entre a la silla turca. El tallo de la hipófisis y sus vasos sanguíneos pasan a través de una abertura en este diafragma. El quiasma óptico yace de 5-10 mm por encima de la silla diafragmática y anterior al tallo (Ganong, 2004; Zee *et al.*, 2003).

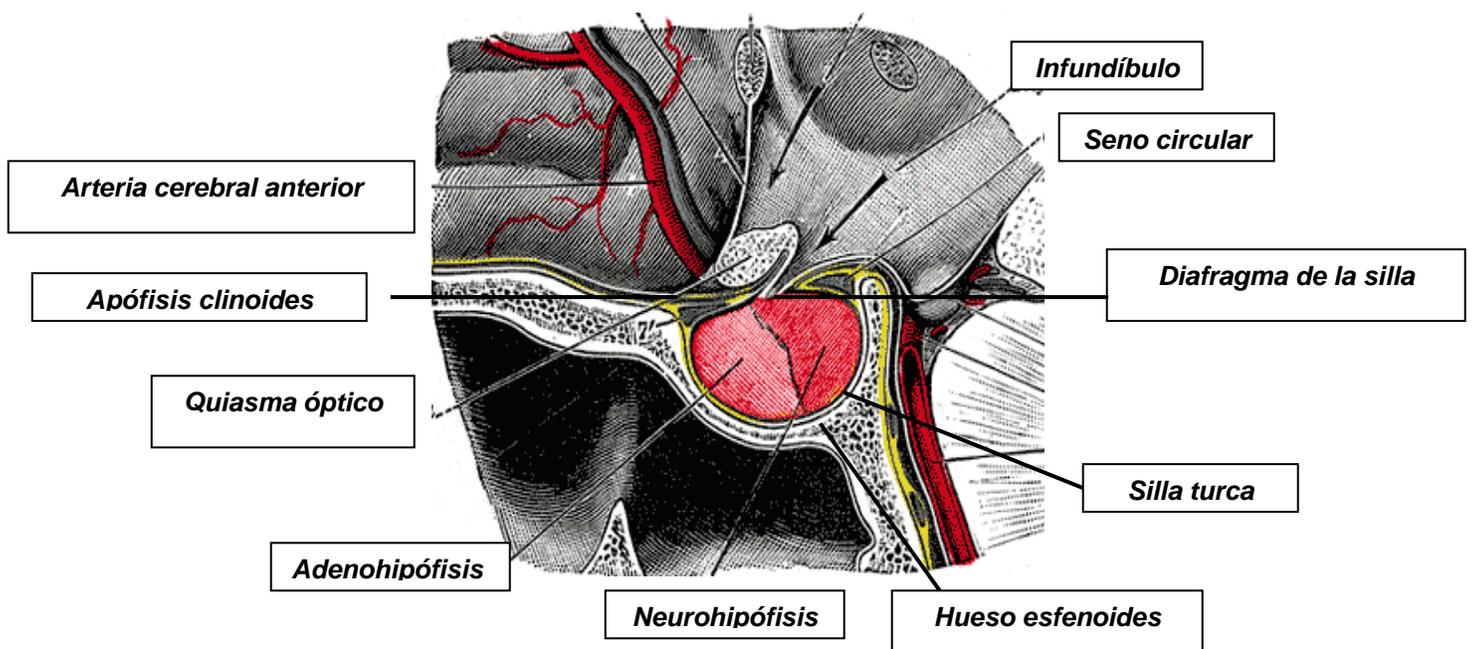
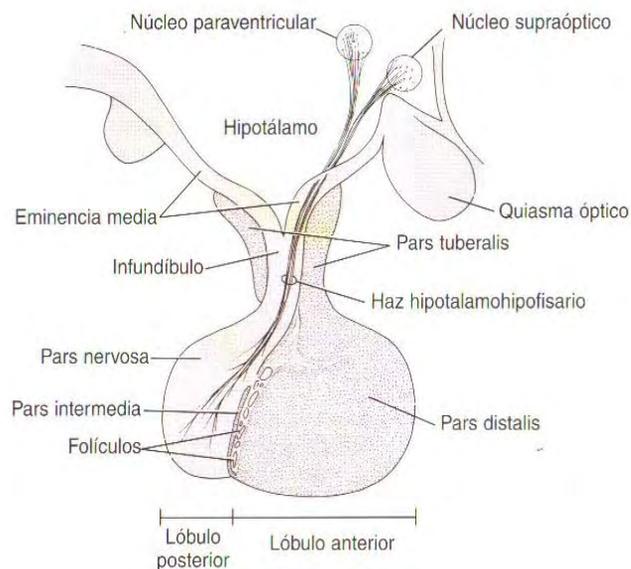


Figura 1. Hipófisis vista desde un corte sagital del cráneo.  
(Tomado de Gray, 2000)

La hipófisis esta compuesta por los lóbulos: anterior o adenohipófisis (pars distalis), medio (pars intermedia) y el lóbulo posterior o neurohipófisis (pars nervosa) (Figura. 2), en los humanos el lóbulo medio es rudimentario (Ganong, 2004). El tamaño de la hipófisis, de la cual el lóbulo anterior constituye dos tercios, mide aproximadamente 15 x 10 x 6 mm y pesa de 500-900 mg (Amar, 2003).



*Figura 2. Glándula hipófisis humana y regiones hipotálamicas relacionadas (Tomado de Ross, 2005)*

## 2.- EMBRIOLOGÍA

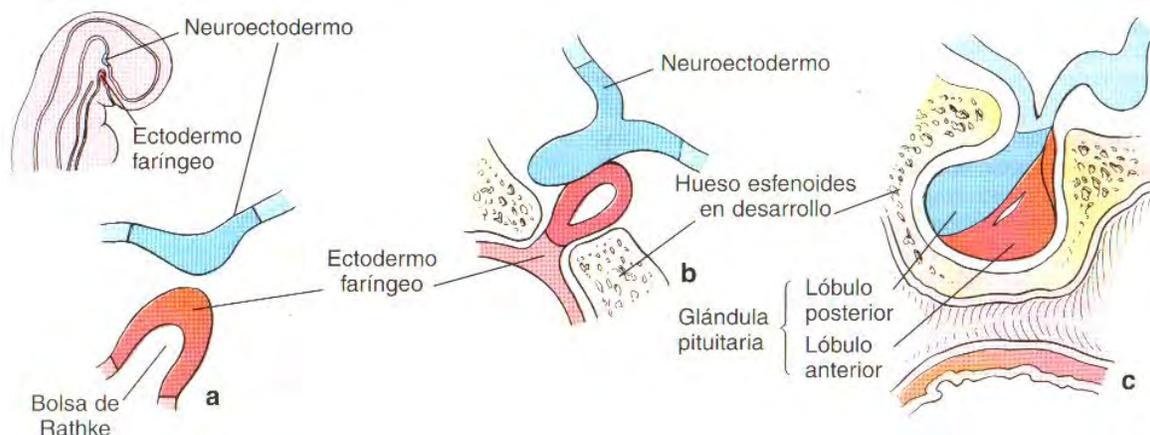
La hipófisis se desarrolla de dos partes completamente distintas durante la etapa inicial del desarrollo embrionario: a) una evaginación ectodérmica del estomodeo, inmediatamente por delante de la membrana bucofaríngea denominada bolsa de Rathke (epitelio ventral) se diferencia en adenohipófisis, mientras que del epitelio dorsal se origina el lóbulo intermedio y b) una prolongación del diencéfalo que da

origen al infundíbulo y este da origen al tallo y a la neurohipófisis (Sadler, 2004; Botelho *et al.*, 2006; Amar, 2003).

Cuando el embrión tiene tres semanas aproximadamente, la bolsa de Rathke se observa como una evaginación de la cavidad bucal y después crece en sentido dorsal hacia el infundíbulo. Hacia el final del segundo mes pierde su conexión con la cavidad bucal y se halla en íntimo contacto con el infundíbulo (Sadler, 2004).

En el curso del desarrollo ulterior, las células de la pared anterior de la bolsa de Rathke aumentan rápidamente en número y forman el lóbulo anterior de la hipófisis o adenohipófisis. Una pequeña prolongación de este lóbulo, la pars tuberalis, crece a lo largo del tallo del infundíbulo y por último lo rodea. La pared posterior de la bolsa de Rathke se convierte en la pars intermedia, que en el ser humano tiene poca importancia (Sadler, 2004).

La neurohipófisis esta formada por células de la neuroglia (pituicitos) y posee además, cierta cantidad de fibras nerviosas provenientes de la región hipotalámica (Figura. 3) (Amar, 2003; Sadler, 2004).



**Figura 3. Desarrollo de la glándula hipófisis.** En este diagrama se representan las etapas esenciales en el desarrollo de la glándula hipófisis (Tomado de Ross, 2005).

La diferenciación histológica de la hipófisis progresa rápidamente en el embrión. Cerca del tercer mes de gestación, un proceso de diferenciación celular da origen a distintas células: acidófilas, que dan origen a las células secretoras de prolactina (PRL) y hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés: Growth Hormone) y células basófilas que dan origen a células secretoras de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés: Adrenocorticotropic Hormone), la hormona estimulante de la tiroides o tirotrópica (TSH, por sus siglas en inglés: Thyroid-stimulating Hormone), la hormona folículo estimulante (FSH por sus siglas en inglés: Follicle-stimulating Hormone ) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés: Luteinizing hormone ). Por medio de técnicas inmunocitológicas puede ser demostrada la presencia de todas las hormonas adenohipofisarias en la hipófisis fetal (Aron *et al.*, 1997; Botelho *et al.*, 2006).

La microscopía electrónica revela la presencia de gránulos de secreción en células adenohipofisarias en fases tempranas de la vida embrionaria. De acuerdo con los descubrimientos morfológicos, la técnica de radioinmunoensayo da evidencias de la producción de varias hormonas adenohipofisarias entre los 2 y 3 meses de gestación (Castillo, 2005).

La neurohipófisis esta compuesta del lóbulo posterior, el infundíbulo y la eminencia media del hipotálamo. Morfológicamente, el material neurosecretor en el lóbulo posterior es claramente visible aproximadamente al quinto mes de la vida intrauterina. Las hormonas neurohipofisarias como la vasopresina y oxitocina, son sintetizadas en el núcleo supraóptico y paraventricular, llamado núcleos magnocelulares del hipotálamo y transportadas a lo largo de axones vía tallo hipofisario hacia el lóbulo posterior. Al final del embarazo, el lóbulo posterior contiene cantidades substanciales de estas dos hormonas (Dorton, 2000). La hipófisis al nacer pesa aproximadamente 100 mg y es un órgano bien desarrollado capaz de secretar todas las hormonas adenohipofisarias (Amar, 2003).

### **3.- RIEGO SANGUÍNEO E INERVACIÓN.**

La irrigación de la hipófisis es especial y esta estrechamente implicada en el control de la actividad secretora de la glándula, ya que los vasos sanguíneos transportan hormonas hipotalámicas estimuladoras e inhibitoras del infundíbulo hacia las células adenohipofisarias (Elster, 2003; Halasz, 1994).

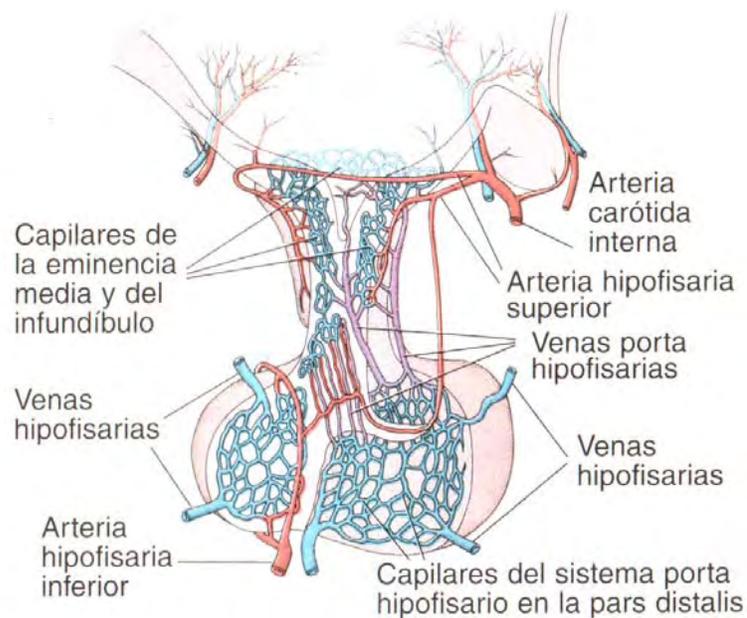
La hipófisis esta irrigada por dos grupos de vasos: las arterias hipofisarias superiores que irrigan la pars tuberalis, la eminencia media y el tallo infundibular. Estos vasos son ramas de las arterias carótidas internas y de las comunicantes posteriores del polígono arterial de Willis; las arterias hipofisarias inferiores irrigan principalmente la pars nervosa (Figura. 4). Una observación funcional importante es que la mayor parte del lóbulo anterior de la hipófisis no tiene irrigación arterial directa (Ross, 2005).

El sistema porta hipotálamo-hipofisario provee el enlace crucial entre el hipotálamo y la hipófisis. Las arterias que irrigan la pars tuberalis, la eminencia media y el tallo infundibular dan origen a capilares fenestrados (plexo capilar primario). Estos capilares drenan en las venas llamadas venas porta hipofisarias, que transcurren a lo largo de la pars tuberalis y dan origen a una segunda red capilar sinusoidal fenestrada (segundo plexo capilar). Este sistema vascular transporta las secreciones neuroendocrinas de los nervios hipotalámicos desde su sitio de liberación en la eminencia media y el tallo infundibular directamente hasta las células de la pars distalis (Ross, 2005).

La mayor parte de la sangre de la hipófisis drena en el seno cavernoso de la base del diencefalo que esta comunicado con la circulación sistémica. Sin embargo, algunos datos indican que la sangre puede fluir a través de venas porta breves desde la pars distalis hacia la pars nervosa y esa sangre desde la pars nervosa puede continuar hacia el hipotálamo (Ross, 2005).

Estas comunicaciones cortas proveen una vía por la cual las hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis podrían ejercer un retrocontrol (*feedback*) directo sobre el encéfalo sin tener que completar todo el circuito de la circulación sistémica (Ross, 2005).

Las vías neurales que entran en el tallo infundibular y la pars nervosa desde los núcleos hipotalámicos son componentes de la neurohipófisis. Los nervios que se introducen en el lóbulo anterior son fibras posganglionares del sistema nervioso autónomo y tienen función vasomotora (Ross, 2005).



*Figura 4. Diagrama de la irrigación de la glándula hipófisis. Las venas porta hipofisarias comienzan en los lechos capilares de la eminencia media y el infundíbulo y terminan en los capilares de la pars distalis (Tomado de Ross, 2005).*

#### 4.- HISTOLOGÍA

La mayor parte de la adenohipófisis tiene la organización típica del tejido endocrino. Las células se distribuyen en cúmulos y cordones separados por capilares sinusoides fenestrados de diámetro relativamente grande. Estas células

responden a señales del hipotálamo y sintetizan y secretan varias hormonas hipofisiarias (Ross, 2005).

Con base en la técnica de tinción de rutina de hematoxilina y eosina, las células de la adenohipófisis originalmente se clasificaron en acidófilas, aquellas afines a la eosina; basófilas, aquellas afines a la hematoxilina; y cromóforas, las que no muestran afinidad definida por alguno de estos dos colorantes (Ross, 2005).

Actualmente mediante la inmunohistoquímica, la cual es una técnica que permite la detección específica de proteínas por medio de la aplicación de anticuerpos, y la microscopía electrónica que muestra las características ultraestructurales de las células, ha sido posible conocer cinco tipos diferentes de células en la adenohipófisis: somatotropas (células secretoras de la GH), lactotropas (células secretoras de PRL), tiotropas (células que secretan TSH), corticotropas (células que secretan ACTH), y gonadotropas (células secretoras de LH) y FSH) (Aron, 2005; Castillo, 2005).

#### **4.1.- Células Somatotropas**

Son células secretoras de GH cuya presencia ha sido identificada a las 8 semanas de gestación, presentan vesículas eosinófilas (células acidófilas) en su citoplasma y por lo común se localizan en las porciones laterales del lóbulo anterior. Estas células constituyen cerca del 40-50% de las células adenohipofisiarias (Shiman, 2005; Ross, 2005).

#### **4.2.- Células Lactotropas**

Las células secretoras de PRL son las últimas células en diferenciarse en la hipófisis fetal humana y se encuentran a partir de las 12 semanas de gestación, poseen vesículas eosinófilas abundantes por lo tanto es una célula de tinción acidófila y tienen distribución aleatoria en la adenohipófisis. Son células poliédricas cuyos gránulos de secreción miden en promedio 550 nm, con núcleo ovalado.

Estas células sufren hipertrofia e hiperplasia durante el embarazo como resultado de los elevados valores de estrógeno y se encargan de que la glándula incremente al doble su tamaño. Estas células constituyen el 15% de las células adenohipofisarias (Aron, 2005; Ross, 2005; Shiman, 2005).

#### **4.3.- Células Tirotropas**

Son células secretoras de TSH que se pueden encontrar en la hipófisis fetal a partir de las 12 semanas de gestación. Debido a su producto glucoproteico, son basófilas y también muestran reacción positiva con la tinción de PAS (*periodic acid-Schiff stain*). Son células poliédricas, grandes, que poseen núcleo redondeado excéntrico, con gránulos de secreción pequeños (50-100 nm); por lo común, estas células se localizan en las porciones anteromedial y anterolateral de la glándula. Durante los estados de insuficiencia tiroidea primaria, las células presentan hipertrofia evidente, aumentando el tamaño de la glándula. Las células tirotropas constituyen el tipo celular hipofisario menos frecuente y comprenden menos del 5% de las células adenohipofisarias (Aron, 2005; Ross, 2005; Shiman, 2005).

#### **4.4.- Células Corticotropas**

Son células secretoras de ACTH, que junto con sus péptidos relacionados, son el primer tipo celular que se desarrolla en la hipófisis fetal humana a partir de las 6 semanas. Son basófilas y también intensamente PAS positivas a causa de las porciones de carbonato asociadas con la POMC (proopiomelanocortina, que es una molécula precursora de la ACTH). Embriológicamente se derivan del lóbulo intermedio y con frecuencia se localizan en la porción anteromedial de la glándula. Son células poliédricas con núcleo redondeado y excéntrico, con gránulos de secreción de aproximadamente 360 nm de diámetro (Aron, 2005; Ross, 2005; Shiman, 2005).

En los estados de exceso de glucocorticoides, los corticotropos sufren desgranulación e hialinización tubular conocida como degeneración hialina de Crooke. Las células corticotropas representan de 15-20% de las células adenohipofisarias (Aron, 2005; Ross, 2005; Shiman, 2005).

#### **4.5.- Células Gonadotropas**

Son células capaces de producir LH y FSH, se pueden encontrar en la hipófisis fetal humana a partir de las 12 semanas de gestación. Sin embargo, estudios inmunocitoquímicos indican que algunas gonadotropas solo producen una u otra hormona. Son células de tinción basófila, porque se tiñen intensamente con colorantes básicos así como con la reacción de PAS. Histológicamente son células ovaladas pequeñas que tienen núcleo esferoidal y excéntrico, cuyos gránulos secretores tienen alrededor de 200 nm de diámetro. Se hipertrofian y ocasionan que la glándula crezca durante los estados de insuficiencia gonadal primaria, como la menopausia, síndrome de Klinefelter y de Turner. Estas células constituyen el 10 % de las células adenohipofisarias y se localizan a lo largo de la adenohipófisis (Shiman, 2005; Aron, 2005; Ross, 2005).

#### **4.6.- Células no secretoras**

Casi la mitad de las células de la adenohipófisis muestran mala tinción citoplasmática con los colorantes histológicos usuales, por ello se han denominado células cromóforas. Sin embargo, cuando se examinan al microscopio electrónico contienen diversos gránulos de secreción debido a que muy probablemente son una etapa de reposo o desgranulación de las células secretoras, más que un tipo específico de células (Walter, 1994).

## **5.- HORMONAS DE LA ADENOHIPÓFISIS**

Las hormonas ACTH, TSH, FSH y LH se denominan hormonas tróficas, porque regulan la actividad de células en otras glándulas endocrinas del organismo, las dos hormonas restantes (GH y PRL), no se consideran tróficas porque actúan directamente sobre los órganos blanco que no son de índole endocrino (Ross, 2005).

### **5.1.- Hormona del Crecimiento**

La hormona del crecimiento (GH; somatotropina), es un polipéptido de 191 aminoácidos (PM 21500) sintetizado y secretado por las células somatotropas de la adenohipófisis y puede ser medida por radioinmunoensayo (RIA), al final del primer trimestre de gestación (Aron, 2005; Shiman, 2005).

La función primaria de esta hormona es el crecimiento, ejerciendo acción directa sobre el hígado, músculo, tejido adiposo y metabolismo del hidrogenocarbonato. Pero su acción estimulante del crecimiento es medida por la somatomedina C (IGF-1) (Jara, 2003; Aron, 2005).

La GH, a través del IGF-1 (Insulin Growth Factor 1), aumenta la síntesis de proteína al aumentar la captación de aminoácidos y acelerar directamente la transcripción y traducción del mRNA. Además la GH, tiende a disminuir el catabolismo de las proteínas al movilizar la grasa como una fuente más eficiente de energía, de manera directa origina liberación de ácidos grasos a partir de tejido adiposo e incrementa su conversión a acetil-Coenzima A, del cual se deriva energía. Este efecto ahorrador de proteínas es un mecanismo importante mediante el cual la GH promueve el crecimiento y desarrollo (Aron, 2005).

La GH también afecta el metabolismo de los carbohidratos. En exceso disminuye su utilización e impide la captación de glucosa por parte de la célula. Esta resistencia a la insulina inducida por GH parece deberse a un impedimento

del receptor a la acción de la insulina. Estos sucesos ocasionan intolerancia a la glucosa e hiperinsulinismo secundario (Aron, 2005).

## **5.2.- Prolactina**

La prolactina es una hormona polipeptídica de 198 aminoácidos (PM 22000), sintetizada y secretada por lactotrofos de la hipófisis anterior. A pesar de que evolucionó a partir de una hormona primordial común a la GH y al lactógeno placentario humano (hPL), la PRL solo comparte 16% de sus aminoácidos con la primera y 13% con el hPL (Aron, 2005).

La PRL estimula la lactancia en el periodo posparto. Durante el embarazo se incrementa la secreción de PRL y, junto con muchas otras hormonas (estrógeno, progesterona, hPL, insulina y cortisol), promueve el desarrollo adicional de las mamas como preparación para la producción de leche. A lo largo del embarazo los estrógenos incrementan el desarrollo de las mamas, pero disminuye el efecto de la prolactina en la lactancia; la disminución de los estrógenos y progesterona después del parto permite el inicio de la lactancia (Lack, 2001).

## **5.3.- Hormona Estimulante de la Tiroides o Tirotropina**

La tirotropina es una glucoproteína (PM 28000) compuesta de dos subunidades, una denominada alfa y otra denominada beta, unidas de manera no covalente. La estructura de la subunidad alfa de TSH asemeja a la de otras moléculas de glucoproteína (FSH, LH y gonadotropina coriónica humana, hCG), pero la subunidad beta difiere de estas glucoproteínas y origina su especificidad biológica e inmunológica. Parece que los péptidos de estas subunidades se sintetizan en vías separadas y se unen antes de que se les agreguen los grupos carbohidrato; entonces se secreta la molécula intacta, lo mismo que pequeñas cantidades de subunidades no unidas (Aron, 2005).

La subunidad beta de TSH se fija a receptores de alta afinidad en la tiroides, lo que estimula la captación de yodo (I), hormonogénesis y liberación de tiroxina o también llamada tetrayodotironina ( $T_4$ ) y la triyodotironina ( $T_3$ ). El proceso tiene lugar a través de la activación de la adenilciclase (una enzima intracelular que cataliza la conversión de adenosintrifosfato (ATP) en adenosinmonofosfato cíclico (cAMP), desempeñando un papel esencial en la activación de receptores de membrana. La secreción de TSH también incrementa el tamaño y la vascularidad de la glándula al promover la síntesis de mRNA y proteína (Aron, 2005).

Su acción biológica consiste en estimular el tropismo (movimiento total o parcial de los organismos como respuesta a un determinado estímulo, siendo este estímulo de agentes físicos o químicos), y función de la tiroides. Tiene un cierto ritmo circadiano con un pico al atardecer (Jara, 2003).

#### **5.4.- Hormona Adrenocorticotrópica o Corticotropina**

La hormona ACTH es un péptido de 39 aminoácidos (PM 4500), que puede ser medida a las 8 semanas de gestación por medio de RIA (Radioinmunoanálisis) y es procesada a partir de una molécula precursora larga, la proopiomelanocortina (POMC; PM 28500). Un solo mRNA dirige la síntesis y el procesamiento de POMC en fragmentos biológicamente más pequeños que incluyen hormona de lactógeno placentario beta (LPH- $\beta$ ), hormona estimulante de los melanocitos alfa (MSH- $\alpha$ ), hormona estimulante de los melanocitos beta (MSH- $\beta$ ), endorfina- $\beta$  y el fragmento del amino terminal de la proopiomelanocortina. Además, las moléculas de carbohidratos se encargan de la tinción basófila de las corticotropas (Shiman, 2005; Aron, 2005).

La ACTH estimula la secreción de glucocorticoides, mineralocorticoides y esteroides sexuales, a partir de la corteza suprarrenal. El extremo amino terminal se encarga de esta actividad biológica. La ACTH se une a los receptores en la superficie de la corteza y estimula la esteroidogénesis a través de cAMP. Por

contener en su molécula la secuencia de aminoácidos de la Hormona Estimulante de los Melanocitos o Melanocortina (MSH), estimula la pigmentación cutánea (Aron, 2005; Jara, 2003).

### **5.6.- Gonadotropinas**

La hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de los folículos (FSH) son glucoproteínas compuestas de subunidades alfa y beta. La subunidad beta específicamente confiere a estas hormonas su actividad biológica única (Aron, 2005). Ambas gonadotropinas se unen a receptores en el ovario y el testículo donde regulan la función gonadal al promover la producción de esteroides sexuales y la gametogénesis (Aron, 2005).

En los varones, la LH estimula la producción de testosterona a partir de las células intersticiales de los testículos (células de Leydig), sin embargo, la maduración de espermatozoides requiere LH y FSH. La FSH estimula el crecimiento testicular y aumenta la producción de una proteína fijadora de andrógenos (ABP) por parte de las células de Sertoli, que constituyen un componente del túbulo testicular, necesario para apoyar la maduración de los espermatozoides. La ABP origina altas concentraciones locales de testosterona cerca del espermatozoide, factor esencial en el desarrollo de la espermatogénesis normal (Aron, 2005; Shiman, 2005).

En las mujeres, la LH estimula la producción de progesterona y testosterona en el ovario. Una descarga normal abrupta de LH a la mitad del ciclo sexual ocasiona ovulación, en tanto que la secreción continua de LH estimula más tarde el cuerpo lúteo, para que produzca progesterona mediante el aumento de la conversión de colesterol a pregnenolona. El desarrollo del folículo ovárico esta controlado en gran medida por la FSH que estimula la formación de los folículos de Graaf, y la secreción de estrógenos por parte de este mismo folículo depende de FSH y LH (Aron, 2005; Shiman, 2005).

## 6.- ADENOMAS HIPOFISIARIOS

Los adenomas hipofisarios son considerados neoplasias benignas, que cuentan con aproximadamente 15% de la expresión hormonal hipofisaria (Pierantoni *et al* 2005). Son de crecimiento lento, de carácter expansivo, confinados en la silla turca. Varios adenomas hipofisarios, sin embargo, son localmente invasivos, presentan un paso acelerado en el crecimiento y propagación dentro de los tejidos vecinos. Clínicamente, los adenomas hipofisarios pueden causar síntomas locales como alteraciones visuales, dolor de cabeza, incremento de la presión intracraneal o daños de varios nervios craneales. Algunos secretan varias hormonas causando elevaciones en los niveles hormonales de la sangre y un cambio mayor en la homeostasis endocrina (Kovacs *et al.*, 2001).

Los adenomas hipofisarios constituyen alrededor del 10-15% de los tumores intracraneales. No hay diferencias significativas en la frecuencia de aparición entre hombres y mujeres. Aunque raramente se diagnostican en la pubertad, los adenomas hipofisarios pueden encontrarse desde la infancia hasta la senectud (Kovacs *et al.*, 2001).

El aumento del tamaño de la silla turca se detecta por examen radiológico. Así, al expandirse la neoplasia a la cisterna supraselar, comprime los grandes vasos sanguíneos (causando cefalea sorda) y la parte inferior central del quiasma óptico (conduciendo a defectos del campo visual, típicamente hemianopsia bitemporal cuadrantita superior). Las neoplasias grandes comprimen la parte más periférica del quiasma, al hipotálamo y a veces al tercer ventrículo, originando hidrocefalia (Chandrasoma, 1994).

Las neoplasias infiltrativas se pueden abrir a los senos paranasales (con alto riesgo de meningitis) o al el seno cavernoso (con producción de trombosis con edema y congestión orbitarios) (Chandrasoma, 1994).

## 7.- CLASIFICACIÓN DE LOS ADENOMAS HIPOFISIARIOS

La clasificación de los adenomas hipofisarios varía ampliamente, pueden clasificarse de acuerdo a la afinidad tintorial del citoplasma celular, tamaño, actividad endocrina, características histológicas, contenido y producción hormonal, características ultraestructurales, composición celular, citogénesis y patrón de crecimiento (Kovacs *et al.*, 2001).

Anteriormente se clasificaban en basófilos (ACTH, TSH, Gonadótropos), acidófilos (GH, PRL) y cromófobos que no necesariamente son no funcionales. Esta clasificación es obsoleta ya que no permite realizar correlaciones clínico-patológicas (Chandrasoma, 1994., Ortiz, 1996).

También han sido clasificados de acuerdo a su tamaño dividiéndolos en microadenomas (dimensión < 1cm) y macroadenomas (dimensión > 1 cm) (Ezzat *et al.*, 2004), y grado de invasión local por tomografía axial computarizada (TAC). Esta clasificación fue propuesta por Jules Hardy que los encierra dentro de cuatro grados (Asa *et al.*, 1998):

Grado 1- Son lesiones intrahipofisarias que miden menos de 1 cm. de diámetro (microadenomas), los cuales pueden ser detectados con técnicas de imagen sofisticadas, no causan destrucción del hueso de la silla (Asa *et al.*, 1998).

Grado 2- Son lesiones que miden más de 1 cm. de diámetro pero todavía se mantienen intrasellarmente o se exhiben en la extensión suprasellar sin causar invasión. El ensanchamiento sellar es usualmente identificado pero estos tumores no causan erosión en el hueso (Asa *et al.*, 1998).

Grado 3- Son tumores que invaden localmente que pueden estar asociados con alargamiento sellar difuso y pueden tener extensión suprasellar, pero en cualquier caso causan erosión en el hueso de la silla turca (Asa *et al.*, 1998).

Grado 4- Son tumores grandes e invasivos que involucran estructuras extraselares incluyendo el hueso, hipotálamo o senos cavernosos (Asa *et al.*, 1998).

La clasificación de estos tumores es un área dinámica que requiere de continuas y exigentes revisiones debidas a los avances en técnicas genéticas moleculares y nuevas tinciones inmunohistoquímicas que proporcionan una profunda perspicacia y un entendimiento claro del número de células y mecanismos patogénicos en tumores adenohipofisarios (Al-Shraim *et al.*, 2006).

La clasificación moderna esta basada en sofisticadas técnicas morfológicas como la inmunohistoquímica, microscopía electrónica de transmisión, microscopía inmunoelectrónica, análisis morfométrico y métodos moleculares como hibridización *in situ* (Kovacs *et al.*, 2001).

Actualmente las clasificaciones determinan la anormalidad endocrinológica dominante como resultado de la secreción elevada de una o más hormonas (clínicamente funcionantes), y aquellos que se manifiestan solo por los efectos del crecimiento local de la neoplasia sin dar síntomas de alteración endocrina (clínicamente no funcionantes). El primero depende del tipo de hormona secretada y el segundo del tamaño de la neoplasia y de su capacidad invasora (Chandrasoma, 1994).

Datos de factores biológicos implicados en la tumorigénesis de la adenohipófisis han sido extensamente explorados y supuestos oncogenes y genes supresores del tumor han sido identificados, así como algunos subtipos de adenomas hipofisarios. Además han sido propuestos marcadores patológicos para afirmar el comportamiento biológico de los adenomas hipofisarios. En el pasado, el concepto de plurihormonalidad fue pobremente entendido. La identificación de factores de transcripción que regulan la diferenciación celular y la producción hormonal permite estructurar una clasificación de adenomas hipofisarios por su citodiferenciación y explicar patrones de la expresión génica plurihormonal (Al-Shraim *et al.*, 2006).

La caracterización morfológica de los adenomas hipofisarios y la correlación de la hormona producida con la secreción hormonal proporciona información útil. Además, la utilización de marcadores tumorales ofrecen información objetiva en el manejo del paciente y predecir respuestas a un tratamiento específico (Kontogeorgos, 2005).

La clasificación de los adenomas hipofisarios se ha unificado tomando en cuenta la histología, la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica de transmisión de células tumorales y la importancia de la producción hormonal, composición celular y citogénesis. Esta clasificación enfatiza la relación estructura-función e intenta correlacionar características morfológicas con la actividad secretora (Kovacs *et al.*, 2001).

### **7.1.- Adenoma Lactotropo**

El Adenoma Lactotropo (también conocido como prolactinoma) es el adenoma hipofisario más común en adultos y ocurre aproximadamente en un 35% de los adenomas hipofisarios funcionantes (Ciccarelli, *et al* 2005). Los adenomas hipofisarios secretores de PRL se desarrollan con mayor frecuencia a partir de las alas laterales de la hipófisis anterior, pero al progresar llenan la silla turca y comprimen los lóbulos anterior y posterior. El tamaño del tumor varía mucho, desde microadenomas hasta tumores invasores grandes con extensión extrasillar, aunque la mayoría de las personas presentan microadenomas (Lack, 2001).

Microscópicamente la mayoría de los prolactinomas están compuestos de células débilmente acidófilas o cromóforas (*prolactinoma escasamente granulados*); pocos prolactinomas son fuertemente acidófilos (*prolactinomas densamente granulados*). La prolactina puede demostrarse dentro de los gránulos secretores en el citoplasma de las células usando técnicas inmunohistoquímicas (Maitra, 2005).

En general, los prolactinomas en una mujer en edad fértil son microadenomas indoloros (Drange *et al.*, 2000). Las pacientes presentan efectos como galactorrea, oligomenorrea, pérdida de libido y disfunción sexual (Arafah *et al.*, 2001).

En contraste, en hombres y en mujeres post-menopáusicas frecuentemente presentan macroadenomas con o sin extensión extraselar (Colao *et al.*, 2003. Delgrange *et al.*, 1997), además causa disminución de la libido, impotencia y galactorrea (Maitra, 2005).

## **7.2.- Adenoma Somatotropo**

Los adenomas hipofisarios secretores de GH provocan aumento en el crecimiento de casi todos los tejidos del cuerpo y originan los síndromes clásicos de gigantismo o acromegalia dependiendo de la edad del paciente. En los niños hay un crecimiento uniformemente excesivo en las epífisis, que produce como resultado un incremento masivo pero proporcionado de estatura (gigantismo) y en los adultos las epífisis fusionadas no permiten un aumento en estatura pero hay un crecimiento generalizado en huesos (más visible en manos, mandíbula y cráneo), y otros tejidos como el aumento en el tamaño del cartílago que conduce al crecimiento de orejas y nariz, (acromegalia). Se producen anomalías articulares, en particular en la columna vertebral que originan osteoartritis, el aumento del tamaño de los tejidos blandos produce rasgos faciales toscos y crecimiento de todas las vísceras, notablemente el corazón, hígado, riñones, suprarrenales, tiroides y páncreas. Hay dos tipos histológicos de adenomas secretores de GH: densamente granulados y escasamente granulados (Aron, 2005, Chandrasoma, 1994).

### *Adenomas somatotropos densamente granulados*

Los adenomas densamente granulados son acidófilos al microscopio óptico en las tinciones de rutina, con una incidencia menor a 8 %. La microscopía electrónica demuestra que las células son similares a los somatotropos normales, es decir,

son esféricas u ovals con características uniformes, núcleo central redondo u oval y abundante citoplasma, los numerosos gránulos esféricos que tienen GH son electrondensos; su tamaño es de 300-600 nm, aunque gran parte mide de 350-450 nm (Aron, 2005).

#### Adenomas somatotropos escasamente granulados

Los adenomas escasamente granulados son cromófobos al microscopio óptico, característica que tan solo refleja la escasez de gránulos secretores que puedan teñirse; son indistinguibles de otros adenomas cromófobos excepto por la demostración de GH dentro de ellos por inmunohistoquímica, con una incidencia del 9%. En microscopía electrónica, las células no semejan somatotropos normales, sino que tienen tamaños y formas variables, núcleos pleomorficos, con frecuencia en forma de media luna y cuerpos fibrosos globulares dentro del citoplasma. Los gránulos secretores miden de 100-250 nm y están presentes en menor cantidad que en somatotropos normales o adenomas densamente granulados (Aron, 2005).

### **7.3.- Adenoma Mamosomatotrofo**

Hay un grupo heterogéneo de adenomas hipofisarios productores de GH-PRL, cuya incidencia es de 1.5%. Se ha postulado que este tipo de adenoma surge de una célula que produce GH y se puede transformar hacia un mamosomatotrofo (productor de GH-PRL). Resultados de estudios en la expresión génica de GH-PRL y la inmunoreactividad en los adenomas hipofisarios productores de GH-PRL, sugieren que el somatotrofo, mamosomatotrofo y adenomas mixtos son neoplasmas estrechamente relacionados (Bilbao, 1996).

El adenoma *Mamosomatotrofo* es un tumor que presenta gránulos que contienen GH y PRL en una misma célula, es de crecimiento lento asociado con acromegalia y ligera hiperprolactinemia, es fuertemente acidofílico con intensa inmunopositividad para GH. La inmunoreactividad para prolactina es variable y

algunos de esos tumores también contienen subunidad  $\alpha$  ( $\alpha$ -SU); (Bilbao, 1996; Asa, 1994).

#### **7.4.- Adenoma mixto GH/PRL**

Expone un curso más agresivo que los adenomas con células de GH puras; los pacientes tienen niveles elevados de GH sérica y grandes variantes de hiperprolactinemia. Inmunohistoquímicamente es un tumor dimorfo, en el cual GH y PRL han sido detectados en diferentes poblaciones celulares dispuestas al azar. La combinación más común es en las células de GH densamente granuladas y células de PRL escasamente granuladas, tiene una incidencia de 4.5% (Bilbao, 1996).

#### **7.5.- Adenomas de célula acidófila madre**

Horvath y colaboradores en 1981 describieron bajo el término *Acidophilic stem cell adenoma*, a neoplasias con características ultraestructurales de células productoras de GH y PRL, aunque de un comportamiento más agresivo por su comportamiento invasivo de crecimiento rápido, que muestra una forma inusual de gigantismo mitocondrial (megamitocondrias), cuerpos fibrosos, retículo endoplásmico rugoso pobremente organizado, extrusión de gránulos secretores, aparato de Golgi primitivo y transformación oncocítica (presencia de mitocondrias en gran cantidad). Endocrinológicamente estos tumores no son funcionales o causan hiperprolactinemia, raramente producen GH, presenta incidencia de 3.5% (Niveiro *et al.*, 2003; Bilbao, 1996).

#### **7.6.- Adenoma Corticotropo**

Con una incidencia de 8%, estos tumores son casi siempre microadenomas (menores de 10 mm de diámetro), ya que el 50% tienen 5 mm o menos de diámetro y se han descrito incluso algunos de 1 mm (Aron, 2005). Causan hipercortisolismo pudiendo desarrollar síndrome de Cushing (Maitra *et al.*, 2005), los cuales son tumores basófilos-cromófilos que pueden encontrarse en cualquier parte dentro de la hipófisis anterior. Pocas veces los tumores secretores

de ACTH son grandes, con tendencias invasoras y con escasa frecuencia se han informado de tumores malignos. A menudo, se observa una zona de hialinización perinuclear como resultado de la exposición de las células corticotropas al hipercortisolismo prolongado (Aron, 2005).

### **7.7.- Adenoma corticotropo silencioso**

Los adenomas corticotropos son diagnosticados como silenciosos solo cuando la información clínica confirma la falta de hipercortisolismo y tienen una incidencia de 6%. Por histología e inmunohistoquímica, los adenomas corticotropos silenciosos son morfológicamente indistinguibles de los adenomas corticotropos funcionantes ordinarios. Hasta ahora no hay un marcador específico para distinguir los adenomas corticotropos silenciosos de los funcionantes. El adenoma corticotropo silencioso subtipo 2 solo puede diferenciarse por microscopía electrónica (Thodou *et al*, 2007).

### **7.8.- Adenoma Gonadotropo**

Con una incidencia de 2.5%, los adenomas hipofisarios secretores de gonadotropinas por lo común son grandes, cromófobos y ocasionan deterioro visual. La mayoría de los pacientes presentan hipogonadismo y muchos panhipopituitarismo (secreción deficiente de las hormonas producidas por la hipófisis) (Lack, 2001).

La valoración hormonal en algunos muestra aumento de la FSH acompañado de valores normales de LH, las concentraciones basales de la subunidad  $\alpha$  también pueden ser elevadas. La presencia simultánea de un aumento de FSH y LH debe sugerir un hipogonadismo primario. Asimismo, la estimulación de hormona liberadora de tirotrópina (TRH) lleva a un aumento en la secreción de FSH en 33% de los casos, así como a un aumento en la LH en 66% (Aron, 2005).

### **7.9.- Adenoma Tirotrupo**

Con una incidencia <1%, los adenomas hipofisarios secretores de tirotrupo, son tumores poco frecuentes que se manifiestan como hipertiroidismo con bocio en presencia de TSH elevada. Los sujetos con tumores secretores de TSH a menudo son resistentes al tratamiento rutinario de eliminación de tiroides, requieren dosis grandes y con frecuencia múltiples de I<sup>131</sup> así como varias operaciones para controlar la tirotoxicosis. Histológicamente son tumores cromófobos, a menudo son muy grandes y originan deterioro visual, lo que alerta al médico respecto de la anomalía hipofisaria. Los individuos con estos tumores no tienen manifestaciones sistémicas extratiroideas de enfermedad de Graves, como oftalmopatía o dermatopatía (Aron, 2005).

### **7.10.- Adenomas Clínicamente No Funcionales**

Alrededor de una tercera parte de los adenomas hipofisarios no están asociados con síntomas clínicos de síndrome de hipersecreción hormonal, pero si, con síntomas de masa intracraneal como dolor de cabeza, hipopituitarismo o alteraciones en el campo visual. Este tipo de tumores son clasificados como adenomas clínicamente no funcionantes (NFPAs, non-functioning pituitary adenomas) (Pierantoni *et al.*, 2005), los cuales casi siempre son grandes (macroadenomas) cuando se establece el diagnóstico; generalmente el tumor crece en tamaño expandiéndose dentro de los confines de la silla la cual es ampliada y redondeada y son de comportamiento invasivo. Los NFPA son uno de los retos más complejos en el campo médico. Dentro de este tipo de adenomas se encuentra el de células nulas y el oncocitoma (Agrawat *et al.*, 2007).

### **7.11.- Adenoma células nulas**

Con una frecuencia del 17%, estos tumores ocasionan síntomas cuando se extienden más allá de la silla, lo cual resulta en una presión sobre las estructuras circundantes en vez de la secreción de una sustancia hormonalmente activa (Kovacs *et al.*, 2001). Sin embargo, las manifestaciones endocrinas muchas veces tienen lugar durante meses o años antes de hacer el diagnóstico y la deficiencia

de gonadotropina es el síntoma habitual mas frecuente. También son usuales el hipoadrenalismo y el hipotiroidismo, pero los síntomas son sutiles y pueden escapar a la observación. Cuando se examinan en el microscopio electrónico muestran un aparato de Golgi rudimentario y gránulos que no o raramente son secretores (Aron, 2005; Bilbao, 1996).

Los adenomas de células nulas muestran inmunotinción positiva de una o más hormonas hipofisarias (Kovacs *et al.*, 2001). Así, hoy en día se ha demostrado por medio de inmunohistoquímica la expresión de hormonas gonadotropas en la mayoría de los casos de adenoma nulo, por lo que en la actualidad se encuadrarían dentro de los de los adenomas clinicamente no funcionantes, algunos adenomas cromóforos secretan PRL; en tanto que algunos secretan TSH (Niveiro *et al.*, 2003; Aron, 2005; Osamura *et al.*, 2000).

#### **7.12.- Oncocitoma**

Con una frecuencia del 6%, los tumores oncocíticos de la adenohipófisis, también conocidos como oncocitomas pituitarios, se caracterizan por abundancia de mitocondrias, la cual puede ocupar hasta el 50% del espacio citoplásmico que normalmente ocupa solo un 8% y opaca a otros organelos. Estos tumores generalmente no están relacionados con evidencias clínicas o bioquímicas de exceso hormonal; en algunos casos, pueden estar acompañados por varios grados de hipopituitarismo, hiperprolactinemia ligera o ambos. El cambio oncocítico puede presentarse en varios otros tipos de adenomas hipofisarios (Kovacs *et al.*, 2001).

#### **7.13.- Adenomas plurihormonales**

Los tumores plurihormonales producen más de una hormona y presentan una incidencia del 2.5%. Morfológicamente pueden ser monoformes o multiformes. Los adenomas plurihormonales monoformes constan de una población celular que produce dos o más hormonas. Las células del adenoma con frecuencia difieren de las células adenohipofisarias no tumorales y su derivación celular podría

permanecer escondida a pesar de extensos estudios morfológicos (kovacs *et al.*, 2001).

Los adenomas plurihormonales multiformes constan de dos o más tipos de células ultraestructuralmente distintas y cada una produce una hormona diferente (kovacs *et al.*, 2001). Los adenomas tirotrópos son con frecuencia plurihormonales (Teramoto *et al.*, 2004).

## **8.- MARCADORES BIOLÓGICOS**

La patogénesis de los adenomas hipofisarios, esta actualmente bajo una amplia investigación de eventos moleculares estrechamente relacionados con factores endógenos/exógenos, que permiten determinar la expansión de poblaciones celulares monoclonales. Los marcadores de proliferación celular son también atractivos para la investigación, porque ayudan a identificar los factores asociados con la regulación del crecimiento tumoral y/o actividad cinética (Jaffrain-Rea *et al.* 2002).

### **8.1.- Ki-67**

El Ki-67 (antígeno) es reconocido por el anticuerpo MIB-1, éste se expresa en las fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M del ciclo celular, es considerado como un factor de proliferación celular (factor de crecimiento) y representa un marcador asociado con la proliferación del tumor invasivo representando así el mejor indicador pronóstico de adenomas hipofisarios. Se ha descrito la correlación entre el hallazgo inmunohistoquímico de Ki-67 como marcadores de la recurrencia del tumor tras la intervención (Jaffrain-Rea *et al.* 2002; Astorga y Acosta, 2003; Paek. *et al.*, 2005; Mastronardi *et al.*, 2001; Kontogeorgos, 2006).

### **8.2.- PTTG-1**

El gen transformante tumoral hipofisario por sus siglas en inglés PTTG-1 (Pituitary Tumor-Transforming Gen-1), fue aislado originalmente de células hipofisarias tumorales de rata y posteriormente fue identificado en el humano. PTTG-1

participa en varios procesos celulares como control de la mitosis (Zur *et al.*, 2001), transformación celular (Zhang *et al.*, 1999) reparación del DNA (Romero *et al.*, 2001) y transactivación de genes (Pei, 2001). En la glándula hipófisis se ha reportado expresión elevada de PTTG-1 en las neoplasias, lo cual correlaciona con invasividad (Boelaert *et al.*, 2003, Morrison *et al.*, 1993). PTTG-1 ha sido recientemente identificado como un gen relacionado con metástasis.

### **8.3.- VEGF**

El factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), es un polipéptido multifuncional que actúa inicialmente como un mitógeno específico de células endoteliales (Vidal *et al.*, 2002) y un inductor de angiogénesis fisiológica y patológica. La angiogénesis que es el crecimiento de nuevos capilares de vasos sanguíneos pre-existentes, es la clave para la tumorogénesis en neoplasias con crecimiento más allá de pocos milímetros de diámetro. El VEGF es también esencial para el desarrollo normal de vasculogénesis y angiogénesis. La presencia del VEGF ha sido ampliamente reportada en adenomas hipofisarios humanos y varias líneas celulares hipofisarias. Sin embargo, los factores que regulan esta expresión en estos tumores aun no han sido ampliamente investigados (Borg *et al.*, 2005).

### **8.4.- Flk-1**

Durante la angiogénesis las células endoteliales liberan enzimas que degradan la membrana basal, migran a través de la membrana para formar un brote, proliferar y extender el vaso; muchos factores de crecimiento actúan como estimuladores o inhibidores de este complejo proceso (Strawn *et al.*, 1996).

El VEGF y uno de estos receptores conocido como Fetal liver kinase-1 (Flk-1), el cual también se expresa específicamente en células endoteliales, es una pareja que juega un rol importante en la formación y brote de vasos sanguíneos dando origen a la vasculogénesis y la angiogénesis. Sin embargo, se ha

encontrado que los receptores de VEGF también pueden expresarse en células no endoteliales, especialmente en células tumorales (Strawn *et al.*, 1996. Onofri *et al.*, 2003).

La inmunoreactividad del Flk-1 ha sido detectada solo en formaciones vasculares en hipófisis normal y en adenomas hipofisarios (Onofri *et al.*, 2003).

### **8.5.- CD-34**

CD-34 es un antígeno de células precursoras del sistema hematopoyético, cuya detección a través de la inmunohistoquímica puede ser útil para identificar células leucémicas y tumores vasculares, pero igualmente ha servido para precisar el diagnóstico de numerosos tumores de partes blandas con apariencia fusocelular. El antígeno CD-34 es una proteína transmembranal inicialmente detectada por las células del sistema linfohematopoyético precursoras de la serie mieloide y presentes en la medula ósea; este antígeno se observa también en el endotelio vascular además en diversos tumores de las partes blandas (Van de Rijn *et al.*, 1994; Drew *et al.*, 2005). En los adenomas marca el endotelio de los vasos sanguíneos, permitiendo analizar la proliferación vascular.

## **9.- TÉCNICAS HISTOPATOLÓGICAS APLICADAS EN EL ANÁLISIS DE LOS ADENOMAS HIPOFISIARIOS**

Los adenomas hipofisarios son un grupo heterogéneo de neoplasias, debido a que se originan de una glándula endocrina formada por diversos tipos celulares, como ya se explicó anteriormente. Es por eso, que en el estudio de los adenomas hipofisarios se aplican diversas técnicas, que en conjunto dan la información necesaria para hacer posible el diagnóstico adecuado.

### **9.1.- Técnica de hematoxilina-eosina**

La hematoxilina es un colorante natural, que fue usado por primera vez alrededor de 1863. Este colorante en combinación con sales de aluminio, hierro, cromo, cobre o tungsteno es una tinción nuclear excelente. El colorante natural activo, la hemateína, se forma por la oxidación de la hematoxilina.

Este proceso de maduración ocurre espontáneamente si las soluciones de hematoxilina se dejan en reposo por varios días. Hay dos procedimientos usados en los laboratorios de histopatología: la hematoxilina de Mayer y la de Harris. En este caso se usó la de Mayer la cual tiñe los núcleos celulares de color azul. Después de la aplicación de la hematoxilina, se usa la solución de eosina para contrastar, ya que esta tiñe el citoplasma de color rosado. La técnica de hematoxilina y eosina es la técnica de rutina usada en los laboratorios de histopatología, ya que permite observar todos los componentes de un tejido dando la información suficiente y confiable para poder dar el diagnóstico en la mayoría de los casos (Allen, 1992).

Cuando se requiere obtener mayor información y caracterización de los tejidos, se aplican técnicas especiales que evidencian la presencia de estructuras y sustancias especiales que permiten averiguar a mayor detalle el estado fisiológico y molecular.

### **9.2.- Técnica de Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica (IHQ), es un método para localizar antígenos específicos en tejidos o células basado en el reconocimiento de antígeno-anticuerpo. Aprovecha la especificidad de la unión de un anticuerpo a su antígeno, para aplicarla a nivel microscópico.

La historia de la inmunohistoquímica se remonta a los años 1940, cuando Coons desarrolló una técnica de inmunofluorescencia para detectar antígenos en

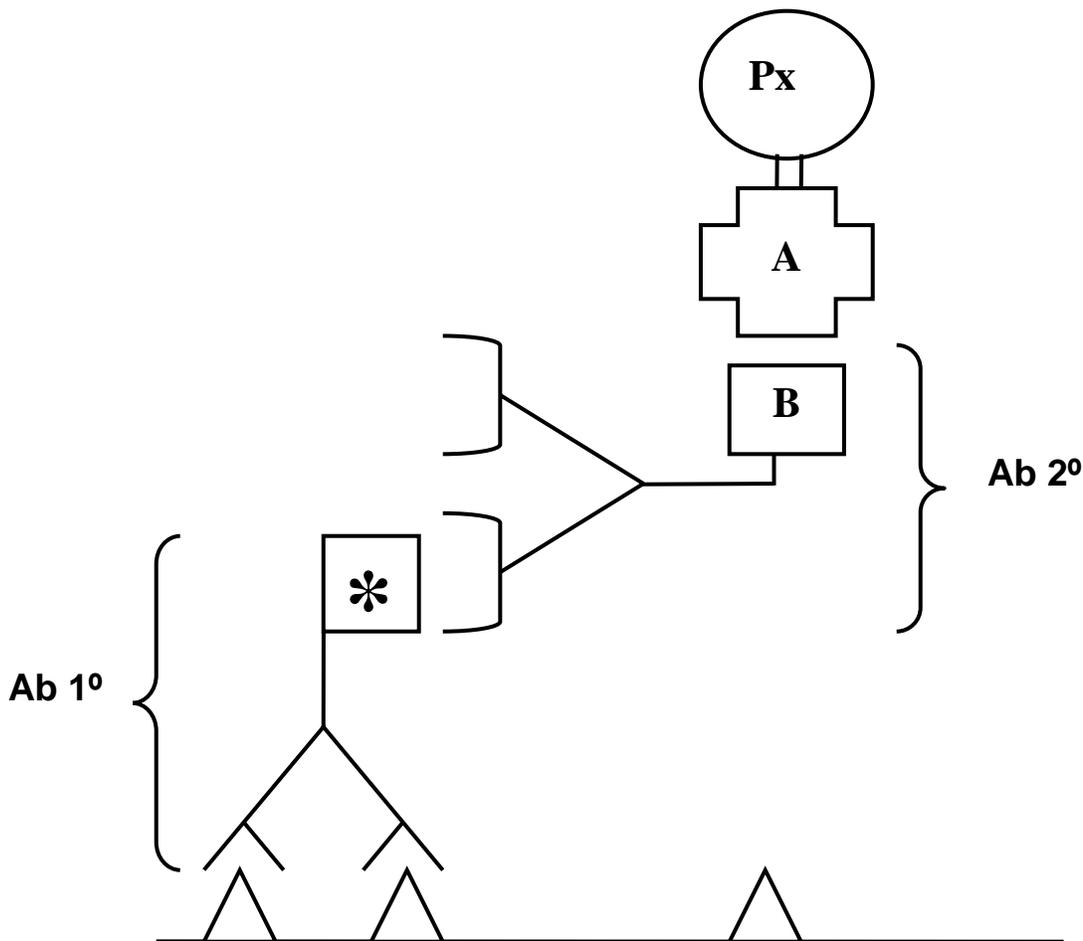
cortes de tejido congelado (Coons, 1941), sin embargo hasta el inicio de los años 1990 se le dio aplicación en la patología (Taylor, 2006).

Nakane y Pierce (1966), posteriormente desarrollaron la técnica de IHQ la cual permite caracterizar diversos tipos celulares por medio del marcaje con anticuerpos por la conjugación de la peroxidasa de rábano, la cual es fácilmente visualizada en tejidos usando a la diaminobencidina como revelador. La presencia de las hormonas de la adenohipofisis fue demostrada por Nakane en 1968 aplicando el método de la inmunoperoxidasa.

Mason en 1969 modificó la técnica de Nakane introduciendo un puente enzimático, que es un anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa, el cual a su vez se une al anticuerpo primario. Sternberger (Sternberger, 1979) desarrolló un nuevo método tomando como base el método de Mason el cual consistía en que el segundo anticuerpo no estuviera marcado y se agregara un tercer componente denominado reactivo PAP, el cual esta formado por complejos inmunes a la enzima peroxidasa y de anticuerpos antiperoxidasa. El segundo anticuerpo ya unido al primario se une al PAP cuando éste es agregado. La unión en mayor cantidad de la enzima por antígeno, amplifica la reacción y eleva la sensibilidad. Posteriormente se realizó otra modificación a la técnica, la cual se basa en la afinidad de la Biotina (una vitamina que puede conjugarse con proteínas), por la Avidina (glicoproteína derivada del huevo) en donde la reacción es irreversible. Por este método el segundo anticuerpo y la enzima peroxidasa son biotinilados.

La Biotina en la enzima peroxidasa es unida con la Avidina, la cual, debido a que esta puede combinarse con cuatro moléculas de Biotina, también se une a la Biotina en el segundo anticuerpo, formando un puente Biotina-Avidina, entre la enzima y el segundo anticuerpo. A través de esta afinidad Biotina-Avidina se incrementa la sensibilidad del ensayo más que en la técnica de PAP (Figura. 5).

En resumen, la técnica inmunohistoquímica involucra la detección de sustancias químicas específicas dentro del tejido por medio del uso de anticuerpos derivados de sustancias. Los anticuerpos son aplicados en secciones de tejido para que encuentren su antígeno correspondiente. Un sistema de detección es empleado para identificar la localización de estos anticuerpos usando moléculas marcadoras que pueden ser visualmente reconocidas. Los anticuerpos son producidos por la introducción de una sustancia química específica a un sistema inmune de especies que no están relacionadas .



*Figura. 5. Método indirecto de avidina-biotina. El anticuerpo primario (Ab 1º) no marcado detecta al antígeno (triángulos). El anticuerpo secundario (Ab2º) marcado con biotina (B) reconoce al determinante antigénico del Ab 1º (asterisco); el Ab 2º se une al complejo avidina – peroxidasa (A-Px). La peroxidasa al estar en contacto con la diaminobencidina toma un color café (cromógeno) que revela la reacción (Taylor, 2006).*

En el estudio de los ADH la IHQ es una herramienta muy útil e importante, ya que nos dará la información necesaria para averiguar la actividad secretora y de esta forma poder realizar su clasificación y correlación histopatológica (Saeger *et al.*, 2007)

### **9.3.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

La microscopía electrónica es una herramienta muy valiosa que nos permite estudiar células de diferentes tejidos con gran detalle ya que por sus características físicas permite analizar los diferentes componentes de los tejidos a grandes aumentos. En los adenomas hipofisarios podemos observar características morfológicas de cada tumor como: presencia de células bien delimitadas de forma poliédrica o alargada, núcleos de forma redondeada o con formas irregulares, retículo endoplásmico rugoso dilatado y arreglado de forma lamelar o concéntrica, ribosomas libres, complejo de Golgi bien desarrollado y mitocondrias escasas, presencia de acúmulos amiloide en el citoplasma celular o en el espacio intercelular; además, gránulos de secreción hormonal pleomórficos, fusionados o con un halo alrededor. Por lo tanto, por medio de la microscopía electrónica se puede realizar el análisis y la clasificación de manera precisa tomando en cuenta las características ultraestructurales del tumor (Vidal *et al.*, 1999)

## JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a sus características histológicas los adenomas hipofisarios son un tipo de neoplasia considerada no maligna, ya que no son capaces de presentar metástasis a distancia, pero pueden tener un comportamiento invasor y de carácter agresivo, por que pueden recurrir haciendo necesaria la intervención quirúrgica hasta en varias ocasiones. Anteriormente se les clasificaba de acuerdo a su afinidad con los colorantes de rutina de la técnica de hematoxilina y eosina, lo cual no daba la información suficiente que pudiera interrelacionar con los signos y síntomas del paciente. Actualmente es necesario estudiar a esta entidad tumoral de manera integral, siendo necesaria la aplicación de técnicas especiales para averiguar las características hormonales, ultraestructurales y de expresión molecular que permitan su clasificación, resultando así en una mejor atención para el paciente. Por otro lado, el comportamiento biológico de los adenomas, a pesar que ha sido estudiado ampliamente aplicando diferentes estrategias histológicas y moleculares, no ha podido ser comprendido debido a la diversa y complicada actividad endocrina de la glándula, por lo que actualmente se aplican técnicas específicas que ayuden a dilucidar su actividad proliferativa. Por esto en el presente trabajo se realizó un estudio de los adenomas hipofisarios que incluyó varios métodos de análisis, para clasificarlos y interrelacionar esta información para conocer un poco más acerca de este tipo de tumores. Esto permitirá realizar un estudio patológico más preciso, interrelacionando las observaciones histopatológicas, con las de la clínica y así ayudar a un mejor tratamiento.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

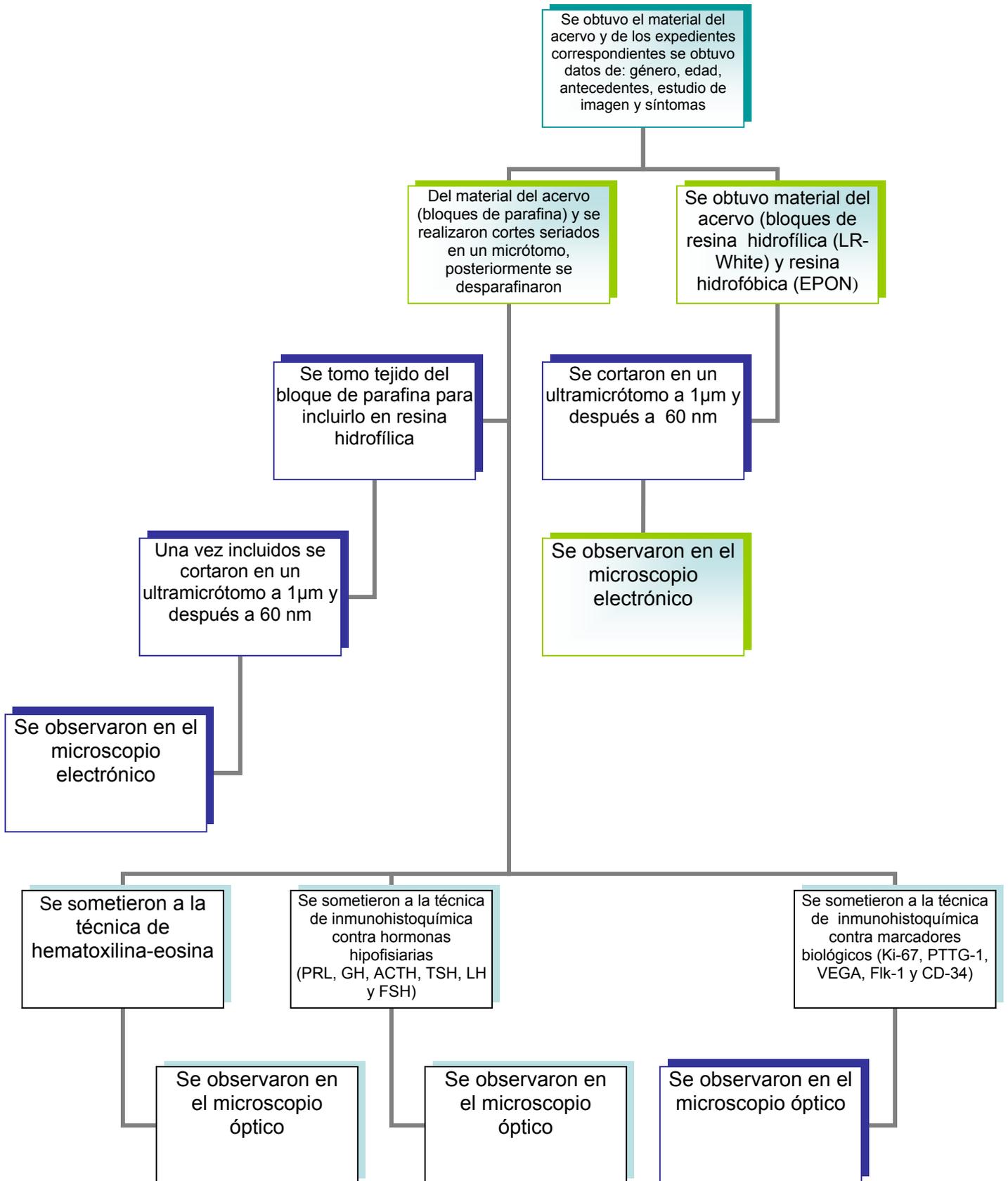
Identificar adenomas hipofisarios de acuerdo con sus manifestaciones clínicas, tamaño de la neoplasia, actividad secretora, características ultraestructurales y patrón de crecimiento por medio de microscopía óptica y electrónica de transmisión.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener de los expedientes de los pacientes las manifestaciones clínicas con que ingresaron a la unidad médica, así como las características del adenoma que se obtuvieron por medio de los estudios de imagen (resonancia magnética y / o tomografía axial computarizada).
2. Averiguar la actividad secretora de los adenomas hipofisarios por medio de la técnica de inmunohistoquímica haciendo uso de anticuerpos para las diferentes hormonas adenohipofisarias.
3. Analizar la actividad proliferativa y la vascularización de los adenomas hipofisarios por medio de la técnica de inmunohistoquímica, aplicando marcadores biológicos, lo cual ayudará a averiguar su comportamiento.
4. Estudiar las características ultraestructurales de los adenomas hipofisarios por medio de microscopía electrónica de transmisión.
5. Desarrollar y evaluar una técnica para rescatar fragmentos de tejido de adenomas hipofisarios incluidos previamente en parafina y procesarlos para microscopía electrónica de transmisión.
6. Clasificar a los adenomas hipofisarios de acuerdo a su actividad secretora y características ultraestructurales.

## **HIPÓTESIS**

Si algunos de los adenomas hipofisarios se caracterizan por su actividad hormonal manifestándose en el paciente por una serie de signos y síntomas de acuerdo a las hormonas secretadas, y otros adenomas hipofisarios no presentan alteraciones endocrinas pero pueden sintetizar hormonas y además ambos tipos pueden tener comportamiento invasivo, entonces la combinación de técnicas inmunohistoquímicas y de microscopía electrónica permitirá la evaluación de los adenomas, de tal forma que será posible realizar una mejor clasificación del tumor de acuerdo a sus características bioquímicas y de expresión de marcadores moleculares y celulares.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de esta tesis se utilizó material del acervo de piezas patológicas del departamento de Neuropatología, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez de la Secretaría de Salud. De este acervo se emplearon los materiales de los casos de adenomas hipofisarios correspondientes a los años 1996 a 2000.

Del registro de las biopsias analizadas en el departamento, se obtuvieron los casos, nombres y números de expediente de cada paciente. Se realizó un análisis detallado de cada uno de los expedientes de los pacientes, de los cuales se tomó registro de los siguientes datos: género, edad, antecedentes, seguimiento de consultas, estudios de imagen (resonancia magnética y tomografía axial computarizada), síntomas de presentación de la enfermedad y perfil hormonal.

Cada una de las biopsias fue fijada en formaldehído al 10% (anexo 1), deshidratada en concentraciones graduales ascendentes de alcoholes y preincluida en parafina, con ayuda de un procesador automático de tejidos (Histokinette 200, Reichert-Jung, American Optical Buffalo, NY) (anexo 2). Posteriormente fueron incluidas en bloques de parafina y de cada una de las muestras, se realizaron cortes seriados (aproximadamente 12 laminillas por caso) a 4  $\mu\text{m}$  de grosor en un micrótopo (Microm HM 320, Germany). Los cortes fueron montados en laminillas pretratadas con silano (3-Aminopropyltriethoxy-silane, Sigma Aldrich Chemical, Steinheim Germany) (anexo 3) el cual les confiere carga a las laminillas y permite una mejor adherencia de los tejidos, evitando que estos se desprendan al ser sometidos a las diferentes técnicas. Los cortes posteriormente se desparafinaron y se hidrataron. Un corte de cada caso fue teñido por el método de hematoxilina-eosina (anexo 4). Las laminillas fueron observadas con un microscopio óptico Olympus CH2 a diferentes aumentos.

## **INMUNOHISTOQUÍMICA**

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica usando el método de Steptavidina-Biotina-Peroxidasa con anticuerpos primarios contra las diferentes hormonas hipofisarias PRL, GH, FSH, LH, TSH (BioGenex, San Ramón, CA) y ACTH (Dako Carpinteria, CA) y marcadores biológicos KI-67 (Dako Carpinteria, CA); PTTG (Zymed, San Francisco CA); Flk-1, VEGF (Santa Cruz, Santa Cruz CA); CD34 (BioGenex, San Ramón, CA).

Las laminillas de cada de cada caso, así como de hipófisis humana normal obtenida en autopsia (control positivo), fueron desparafinadas e hidratadas, se bloqueó la peroxidasa endógena y los sitios antigénicos inespecíficos. Posteriormente las laminillas se incubaron en los anticuerpos primarios: PTTG-1 (dilución 1:100), Ki-67 (dilución 1:100), VEGF (dilución 1:50), Flk-1 (dilución 1:50) y CD 34 (concentración estándar lista para usarse). Después de desparafinar e hidratar, se realizó un paso intermedio de recuperación de sitios antigénicos para desenmascarar los antígenos, que serán reconocidos por los anticuerpos, que fueron bloqueados por el proceso de fijación (anexo 5).

Se realizó la detección de la reacción utilizando el kit Super Sensitive Link-Label IHQ (BioGenex, San Ramón Ca, USA) y se reveló con diaminobencidina con el kit Liquid DAB (BioGenex, San Ramón Ca. USA) (anexo 5). Las laminillas fueron analizadas en un microscopio óptico Olympus CH2.

## **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Para el procesamiento por microscopía electrónica, primero se observaron los cortes de parafina teñidos con hematoxilina y eosina y se seleccionó la zona a analizar. Los tejidos fueron tomados del bloque de parafina, se desparafinaron, se preincluyeron e incluyeron en una resina hidrofílica (anexo 6).

Una vez incluidos, se cortaron en un ultramicrotomo (OM U 3, Reichert Jung, Austria) a un grosor de 1  $\mu\text{m}$ , se tiñeron con azul de toluidina y se observaron en el microscopio óptico mencionado a diferentes aumentos. Una vez que se ubicó un sitio adecuado en el corte de 1  $\mu\text{m}$ , se realizaron cortes finos de aproximadamente 60 nm (en el rango de colores gris-plata del espectro de colores de interferencia); se contrastaron con los metales pesados, acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10-A. Se tomaron micrografías electrónicas en un rollo de película de alto contraste (Kodalith, Kodak), el cual fue revelado y se imprimieron las fotografías en papel (Kodabrome F-2, Kodak).

En otras biopsias fue posible procesarlas directamente para la técnica para microscopía electrónica con resina hidrofílica (anexo 6); y los fragmentos de otras biopsias fueron procesados con la técnica de resina hidrofóbica (EPON), los cuales fueron fijados en glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de cacodilatos y post-fijados con tetraóxido de osmio (Sigma); deshidratados e incluidos en una resina hidrofóbica EPON (Merk). Por último se realizaron cortes y contraste como ya se indicó anteriormente (anexo 7).

### **Hematoxilina y eosina**

Los cortes de cada uno de los casos fueron analizados con ayuda de un neuropatólogo experto, quien con base a las características histopatológicas dio el diagnóstico de adenoma hipofisario.

### **Inmunohistoquímica**

La actividad secretora detectada por medio de los anticuerpos contra las diferentes hormonas adenohipofisarias, fue evaluada en cada uno de los casos de forma semicuantitativa. De acuerdo a la intensidad de la positividad, se determinó que la reacción era baja: +, media: ++ o alta: +++.

Con los anticuerpos de los marcadores biológicos (PTTG-1, Ki-67, VEGF y Flk-1) se calculó un índice de marcaje, el cual consistió en contar el número de células positivas en una población de 100 células en 10 campos a un aumento de 40X, dando como resultado el porcentaje promedio de células positivas para cada caso analizado,  $\pm$  la desviación estándar. Para la evaluación de la proliferación vascular marcada con el anticuerpo CD34, se contó el número de vasos marcados en 10 campos a un aumento de 40X, reportando como resultado el número de vasos promedio por campo para cada caso analizado,  $\pm$  la desviación estándar. La evaluación del marcaje con todos los anticuerpos se realizó en zonas con la mayor densidad celular.

### **Microscopía electrónica**

La ultraestructura de los adenomas hipofisarios fue observada en un microscopio electrónico de transmisión, analizando la conservación celular, integridad de las membranas celulares y nucleares, presencia y morfología de organelos celulares, así como presencia y densidad de gránulos de secreción. Con esta información se realizó la correlación entre la ultraestructura, el tipo de hormona secretada identificada con IHQ, el cuadro clínico del paciente y su comportamiento biológico, analizado con los marcadores biológicos (Ki-67, PTTG-1, VEGF, Flk-1 y CD-34).

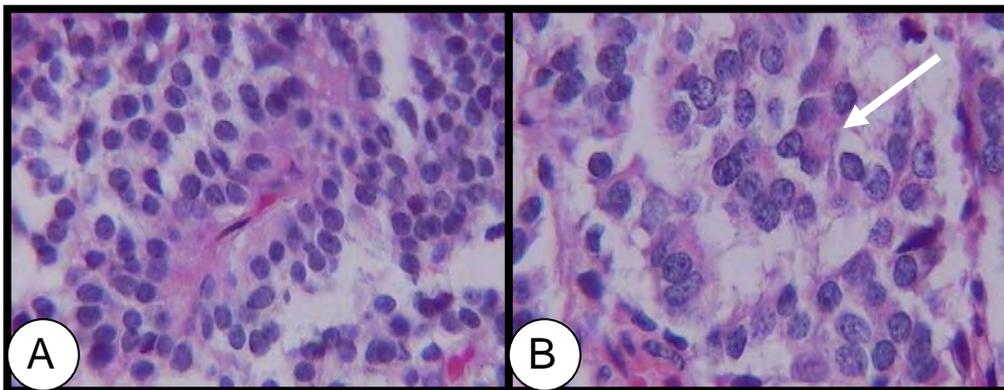
La ultraestructura de los adenomas también se evaluó comparando la conservación del tejido entre las biopsias procesadas directamente para microscopía electrónica y las que fueron rescatadas del bloque de parafina, con el fin de analizar la utilidad de esta técnica.

## RESULTADOS

Se obtuvieron 37 adenomas hipofisarios correspondientes a 36 pacientes (un paciente con dos biopsias: una en el año 1996 y otra en el año 1997) los cuales correspondieron a 58.33% (21) de mujeres y 41.66% (15) de hombres, con un rango de edad 15-76 años y con un promedio de 47.52 años.

De los 36 pacientes estudiados 23 fueron macroadenomas y 2 fueron microadenomas, el resto no mostraba este dato en su expediente.

Con la tinción de hematoxilina y eosina los tumores mostraron gran densidad celular, con núcleos redondeados de tamaño uniforme, no se encontraron células en mitosis (Figura. 1).



*Figura. 1. Cortes de adenoma hipofisario teñido con hematoxilina y eosina. Se muestran células de morfología homogénea. Algunas células muestran características acidófilas indicada por el color rosado del citoplasma (flecha), producto de la afinidad a la eosina. (A: 200X; B: 400X)*

### ADENOMAS HIPOFISIARIOS CLÍNICAMENTE NO FUNCIONANTES

De los pacientes estudiados, 26 biopsias fueron de adenomas clínicamente no funcionantes, 17 mujeres y 9 hombres, cuyo promedio de edad fue de 56.8 y 51 años respectivamente. Los pacientes presentaron como síntomas, cefalea,

disminución progresiva de la agudeza visual y un hombre de 19 años además presentó disminución de la libido.

La detección del contenido hormonal para cada uno de los casos se realizó por medio de la técnica de IHQ (Tabla 1). El perfil hormonal de estos pacientes no mostró secreción elevada con respecto a los rangos de normalidad.

No.	No. De Caso	Edad años	Sexo	INMUNOHISTOQUIMICA					
				PRL	GH	FSH	LH	TSH	ACTH
1	1	61	F	-	-	+++	-	-	-
2	2	47	F	-	-	-	-	-	-
3	3	63	F	-	-	+++	++	-	-
4	5	61	F	-	-	-	-	-	-
5	6	75	F	-	-	++	-	-	-
6	7	66	F	-	-	-	+	-	-
7	8	18	F	+	-	-	-	-	-
8	9	43	M	-	-	++	+	-	-
9	10	50	F	-	-	+	+	-	-
10	11	58	M	-	-	+	-	-	-
11	18	63	F	-	-	+	+	-	-
12	19	64	F	-	-	+	-	-	-
13	20	75	F	-	-	+	-	-	-
14	21	54	F	-	-	-	-	-	-
15	22	51	F	-	-	+	-	-	-
16	23	46	M	-	-	+	+	-	-
17	24	19	M	-	-	+	-	+++	+++
18	25	52	F	-	-	+	-	-	-
19	28	76	M	-	-	+	+	-	-
20	29	43	M	-	-	+++	-	-	-
21	30	75	F	-	-	+	-	-	-
22	31	21	M	-	+	+++	-	+++	-
23	33	58	M	+	-	-	-	-	-
24	34	26	F	+	+	++	-	-	-
25	35	49	M	-	-	-	-	-	-
26	36	66	F	-	-	-	-	-	-

Tabla 1. Evaluación semi-cuantitativa de adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes. F= femenino; M= Masculino; PRL= prolactina; GH= hormona de crecimiento; FSH=hormona estimulante del folículo; LH= hormona luteinizante; TSH= hormona estimulante de la tiroides; ACTH= hormona adrenocorticotrópica. - = reacción negativa; + = reacción baja; ++ = reacción media; +++ = reacción alta.

De manera general en el grupo de adenomas clínicamente no funcionantes se encontró que 19 pacientes resultaron positivos para la secreción de hormonas gonadotrópicas, solas o en combinación con otras hormonas; 2 para prolactina y en 5 no se identificó secreción hormonal (Tabla 2)

En 7 pacientes mujeres se presentó recurrencia después de la intervención realizada y en 4 pacientes mujeres ya se había intervenido previamente por adenoma, en el resto de pacientes mujeres no se presentó recurrencia.

En 4 pacientes hombres se presentó recurrencia después de la intervención. En 3 pacientes hombres se habían intervenido por adenoma hipofisiario, uno en dos ocasiones; y dos en tres ocasiones, el resto de pacientes hombres no se presentó recurrencia.

Género	n	Edad promedio	PRL	FSH	LH	PRL-GH-FSH	FSH-LH	FSH-TSH-ACTH	FSH-TSH-GH	NS
F	17	56.8	1	7	1	1	3	0	0	4
M	9	51	1	2	0	0	3	1	1	1

*Tabla 2. Actividad secretora detectada por inmunohistoquímica, de los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes. PRL= Prolactina; GH=hormona del crecimiento; FSH = hormona folículo estimulante; LH= hormona luteinizante; TSH= hormona estimulante de la tiroides; ACTH= hormona adrenocorticotrópica; NS= adenoma no secretor*

## **ADENOMAS HIPOFISIARIOS CLÍNICAMENTE FUNCIONANTES**

Usando la técnica de inmunohistoquímica se pudo determinar la actividad secretora de los diferentes adenomas hipofisarios (Figura. 2). La detección del contenido hormonal para cada uno de los casos se muestra en la Tabla 3.

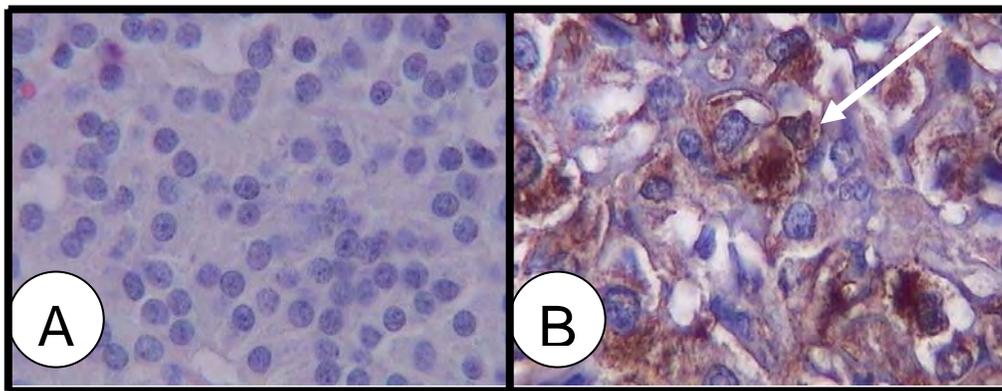


Figura. 2. Cortes de adenoma hipofisario teñido con la técnica de inmunohistoquímica. A) Corte de adenoma hipofisario tomado como control negativo de la técnica, en donde no se observa detección (400X). B) corte de adenoma hipofisario con actividad secretora a prolactina indicada por el color café del citoplasma (flecha), (400X).

No.	No. De Caso	Edad	Sexo	INMUNOHISTOQUIMICA					
				PRL	GH	FSH	LH	TSH	ACTH
1	4	48	F	-	+	-	-	-	-
2	12	42	M	-	-	-	-	-	-
3	13	26	M	-	-	-	-	-	+++
4	14	15	M	+	+	+	-	-	-
5	15	29	M	+	+	-	-	-	-
6	16	39	M	-	+	+	-	-	-
7	17	17	M	+	+	+	-	-	-
8	26	15	M	+	+	+	-	-	-
9	27	51	F	-	+	-	-	-	+++
10	32	34	F	-	++	-	-	-	++
11	37	28	F	-	+	-	-	-	-

Tabla 3. Evaluación semi-cuantitativa de adenomas hipofisarios clínicamente funcionantes. PRL= Prolactina; GH=hormona del crecimiento; FSH = hormona folículo estimulante; LH= hormona luteinizante; TSH= hormona estimulante de la tiroides; ACTH= hormona adrenocorticotrópica; NS= adenoma no secretor; - = reacción negativa; + = reacción baja; ++ = reacción media; +++ = reacción alta.

El perfil hormonal de estos pacientes mostró secreción elevada con respecto a los rangos de normalidad. De los pacientes estudiados, 11 biopsias fueron de adenomas hipofisarios clínicamente funcionantes, 4 mujeres y 7

hombres cuyo promedio de edad fue de 40 y 28 años respectivamente; los cuales presentaron síntomas relacionados con la hipersecreción hormonal: para hormona del crecimiento presentó acromegalia (incremento del tamaño de las manos así como en talla de zapatos), además se presentó disminución de la agudeza visual y cefalea, los pacientes presentaron niveles de GH de 28.3-55.4 ng/ml por encima del rango normal de 0.0-20.0 ng/ml. Para ACTH los pacientes presentaron síntomas de la enfermedad de Cushing (con mala distribución de la grasa notando cara redonda y tórax ensanchado), así como disminución de la agudeza visual, disminución del apetito sexual, caída del cabello y cefalea. En un caso el cortisol se encontró en (282.3 ng/ml) siendo de 50-250 ng/ml el rango normal; en otro caso el paciente presentó niveles de cortisol dentro de los parámetros normales pero los síntomas clínicos muestran características de enfermedad de Cushing.

En general en el grupo de adenomas clínicamente funcionantes se encontró que 7 resultaron positivos para la hormona del crecimiento, sola o en combinación con otras hormonas; 1 para la hormona adrenocorticotrópica; y en 3 no se identificó secreción hormonal. Cabe destacar que en dos biopsias que pertenecen al mismo paciente fue encontrado por medio de la técnica de inmunohistoquímica positivo para las hormonas del crecimiento, prolactina y folículo estimulante pero sus síntomas clínicos mostraban características de enfermedad de Cushing (Tabla 4)

Género	n	Edad promedio	GH	ACTH	PRL-GH	GH-PRL-FSH	GH FSH	GH ACTH	NS
F	4	40.5	2	0	0	0	0	2	0
M	7	28.16	0	1	1	1	1	0	3

*Tabla 4. Actividad secretora, detectada por inmunohistoquímica, de los adenomas hipofisarios clínicamente funcionantes PRL= Prolactina; GH=hormona del crecimiento; FSH = hormona folículo estimulante; ACTH= hormona adrenocorticotrópica; NS= adenoma no secretor.*

### **MARCADORES BIOLÓGICOS**

De las 26 biopsias obtenidas en pacientes que presentaron adenomas clínicamente no funcionantes, en 19 se realizó la técnica de inmunohistoquímica para marcadores biológicos. No fue posible realizar este análisis en todos los casos debido a que en algunos de ellos la cantidad de tejido tumoral obtenido por neurocirugía no fue suficiente y se dio prioridad al análisis de H-E y de inmunohistoquímica para hormonas hipofisarias. En otros casos la muestra se perdió en el proceso o se presentó necrosis en el tejido.

### **ADENOMAS HIPOFISIARIOS CLINICAMENTE NO FUNCIONANTES**

Los adenomas clínicamente no funcionantes fueron evaluados para cada una de los marcadores biológicos (Tabla 5).

No. Caso	CLASIFICACIÓN		% Ki-67 ± DS	% PTTG-1 ± DS	% Fik-1 ± DS %	% VEGF ± DS	% CD34 ± DS
1	CNF	FSH	+	ND	89.7± 4	94.5 ± 2.6	4.4±1.1
2	CNF	NS	ND	Débil 29±6.6	15.8± 2.6	14.2 ± 1.7	8.7±4.5
3	CNF	FSH-LH	5.3±2.5	2.8±0.9	16.1±4.6	ND	25.4±8.9
5	CNF	NS	1.7 ± 0.8	40.0±3.8	19.5±2	19 ± 3.5	8.6±1.2
6	CNF	FSH			25.4±5.3		42.2±4.3
7	CNF	LH	4 ± 1.4	71.9± 17.3		20 ± 3.7	15.6±3.2
9	CNF	FSH-LH	8±1.2	11.1±1.2	11.2± 2.1	11.3± 1.5	10.2±1.6
11	CNF	FSH	3.2 ± 1				
19	CNF	FSH	8.7 ± 3 .2	26.4±4.5	30±4.9	29.8± 3.9	8.5±2.2
20	CNF	FSH	5.8 ± 2.6	81.4 ± 9.3	41.6 ± 10.2	38.3± 9.5	15.8±3.4
21	CNF	NS	5.3± 1.6	33.9±6.9	ND	12.2± 2.5	8.2±1.8
22	CNF	FSH	16.7±5.8	34±6.1	4.17±5.4	34.1±2.2	10±2.1
24	CNF	FSH- TSH- ACTH	30.2±9	27.9 ± 4.8	24±1.4	32.5 ± 4.3	7±1.6
25	CNF	FSH		16.8 ± 2.7	42.4 ± 18.3		7±1.6
28	CNF	FSH-LH	NECRO	18.6 ± 1.9	ND	NECRO	16.2±3.1
29	CNF	FSH	6.6± 2.5	24.2 ± 2	25± 1.5	30.8 ±7.3	11.1±3.1
30	CNF	FSH	1.4±0.5	18±1.6	26.7±5.5	35.1±4.4	10.8±1.8
31	CNF	GH-FSH- TSH	ND	16.9±2.7	14.7±3	26.4 ± 3.6	9.6±1.6
34	CNF	PRL-GH- FSH	9±1.4	19.2±1.9	20.5 ± 3.4	97.2 ± 3.3	12.7±3.6

*Tabla 5- Índice de marcaje expresado en porcentaje, de los marcadores biológicos en adenomas clínicamente no funcionantes. CNF= clínicamente no funcionantes, NS= no secretor, ND= no determinado, NECRO= necrosis, FSH = hormona folículo estimulante, LH= hormona luteinizante, TSH= hormona estimulante de la tiroides; ACTH= hormona adrenocorticotropica, Prl= Prolactina; GH=hormona del crecimiento, DS= desviación estándar.*

**Ki-67.**

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica para el Ki-67 en 13 biopsias. El índice de marcaje para este tipo de adenomas fue de  $8.1 \pm 7.4$ ; en la evaluación se puede observar que los adenomas positivos a FSH presentan el índice de marcaje más alto en comparación con los adenomas que fueron positivos a GH o LH. En el caso del adenoma mixto el índice de marcaje esta elevado porque solo se cuenta con una biopsia lo que hace que se eleve el porcentaje (Tabla 6).

CLASIFICACIÓN	% PROMEDIO $\pm$ DS
CNF	$8.1 \pm 7.4$
CNF-S	$8.9 \pm 7.7$
CNF-NS	$3.5 \pm 1.8$
CNF-Gonadotropos	$6.6 \pm 4.2$
CNF – FSH / LH	$6.6 \pm 1.3$
CNF-FSH	$7.1 \pm 4.9$
CNF-LH	$4.0 \pm 1.4$
CNF-Mix	$19.6 \pm 10.6$

*Tabla 6- Índice de marcaje expresado en porcentaje, del Ki-67 en adenomas clínicamente no funcionantes. CNF= Clínicamente no Funcionantes; CNF-S= Clínicamente no Funcionantes Secretores; CNF-NS= Clínicamente no Funcionantes No Secretores; CNF-Gonadotropos= Clínicamente no Funcionantes secretores de gonadotropinas combinadas y por separado; CNF-FSH / LH= Clínicamente no Funcionantes Secretores de gonadotropinas combinadas; CNF-FSH= Clínicamente no Funcionantes secretores de Hormona Folículo Estimulante; CNF-LH= Clínicamente no Funcionantes secretores de Hormona Lutenizante; CNF-Mix= Clínicamente no Funcionantes Mixtos, DS= desviación estándar.*

**PTTG-1.**

El marcador biológico PTTG-1 se evaluó en 16 biopsias, la expresión del PTTG-1 en este tipo de adenomas fue de  $29.5 \pm 20.0$  y se puede observar que los adenomas secretores de LH presentan una mayor expresión con  $71.9 \pm 17.3$  que

los adenomas positivos a FSH, GH o mixtos donde la expresión es menor (Tabla 7).

CLASIFICACIÓN	% PROMEDIO $\pm$ DS
CNF	29.5 $\pm$ 20.0
CNF-S	28.4 $\pm$ 22.0
CNF-NS	34.3 $\pm$ 4.5
CNF-Gonadotropos	30.5 $\pm$ 24.5
CNF – FSH / LH	10.8 $\pm$ 6.4
CNF-FSH	33.5 $\pm$ 22.2
CNF-LH	71.9 $\pm$ 17.3
CNF-Mix	21.3 $\pm$ 4.7

*Tabla 7- Índice de marcaje expresado en porcentaje, del PTTG-1 en adenomas clínicamente no funcionantes. CNF= Clínicamente no Funcionantes; CNF-S= Clínicamente no Funcionantes Secretores; CNF-NS= Clínicamente no Funcionantes No Secretores; CNF-Gonadotropos= Clínicamente no Funcionantes secretores de gonadotropinas combinadas y por separado; CNF-FSH / LH= Clínicamente no Funcionantes Secretores de gonadotropinas combinadas; CNF-FSH= Clínicamente no Funcionantes secretores de Hormona Folículo Estimulante; CNF-LH= Clínicamente no Funcionantes secretores de Hormona Luteinizante; CNF-Mix= Clínicamente no Funcionantes Mixtos, DS= desviación estándar.*

#### **Flk-1, VEGF, CD-34**

Estos marcadores fueron evaluados juntos ya que dan información de la angiogénesis y vascularidad en el tejido. Para los ADH CNF la expresión del VEGF se evaluó en 14 biopsias y su expresión fue de 35.8  $\pm$  25.3, los adenomas positivos a FSH son los que presentan un índice mayor con respecto a adenomas positivos a GH o LH, los adenomas mixtos presentan valores elevados ya que solo se cuenta con una muestra y hace que se eleve sus valores; de su receptor el Flk-1, evaluado en 15 biopsias, su expresión fue de 22.9 $\pm$ 19.0, los adenomas positivos a FSH son los que presentan el mayor índice de marcaje en comparación

con los adenomas positivos a GH o Mixtos. Por último el marcaje a CD-34, evaluado en 18 biopsias, fue de  $11.4 \pm 4.8$ , teniendo los valores más elevados los adenomas que presentaron positividad a las gonadotropinas en combinación (FSH / LH), en comparación con los positivos a GH o mixtos (Tabla 8).

CLASIFICACIÓN	% PROMEDIO $\pm$ DS		
	Flk-1	VEGF	CD-34
CNF	22.9 $\pm$ 19.0	35.8 $\pm$ 25.3	11.4 $\pm$ 4.8
CNF-S	31.9 $\pm$ 19.7	41.0 $\pm$ 25.7	12.1 $\pm$ 5.07
CNF-NS	13.6 $\pm$ 1.8	15.1 $\pm$ 2.8	8.5 $\pm$ 0.2
CNF-Gonadotropos	35.5 $\pm$ 21.1	37.3 $\pm$ 22.0	12.8 $\pm$ 5.4
CNF – FSH / LH	13.6 $\pm$ 2.4	11.3 $\pm$ 1.5	17.3 $\pm$ 6.2
CNF-FSH	40.9 $\pm$ 20.0	43.5 $\pm$ 21.0	10.1 $\pm$ 3.4
CNF-LH		20.0 $\pm$ 3.7	15.6 $\pm$ 3.2
CNF-Mix	19.7 $\pm$ 3.8	52.0 $\pm$ 32.0	9.8 $\pm$ 2.3

*Tabla 8- Índice de marcaje expresado en porcentaje de los marcadores Flk-1, VEGF y CD-34 en ADH clínicamente no funcionantes. CNF= Clínicamente no Funcionantes; CNF-S= Clínicamente no Funcionantes Secretores; CNF-NS= Clínicamente no Funcionantes No Secretores; CNF-Gonadotropos= Clínicamente no Funcionantes secretores de gonadotropinas combinadas y por separado; CNF-FSH / LH= Clínicamente no Funcionantes Secretores de gonadotropinas combinadas; CNF-FSH= Clínicamente no Funcionantes secretores de Hormona Folículo Estimulante; CNF-LH= Clínicamente no Funcionantes secretores de Hormona Luteinizante; CNF-Mix= Clínicamente no Funcionantes Mixtos, DS= desviación estándar.*

## ADENOMAS HIPOFISIARIOS CLÍNICAMENTE FUNCIONANTES

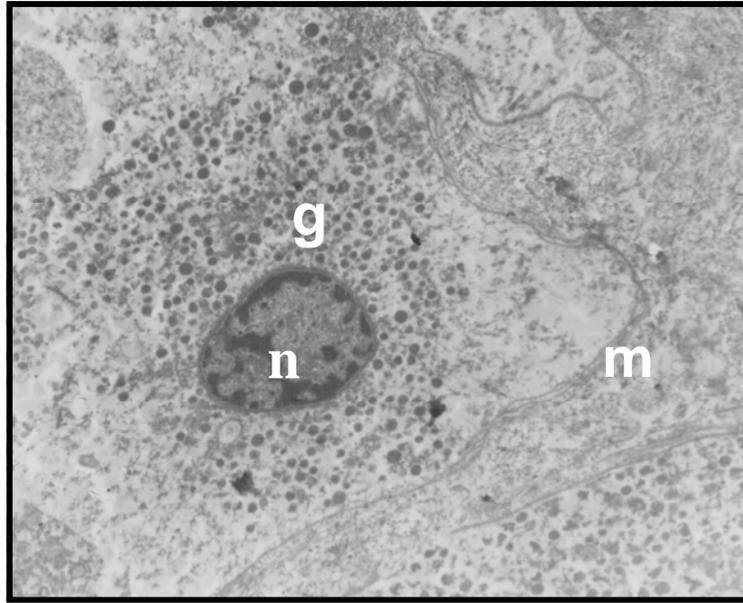
De las 11 biopsias tomadas de los pacientes que presentaron adenomas clínicamente funcionantes se evaluaron 4 casos, el índice promedio de marcaje de Ki-67 fue de  $4.4 \pm 1.8$ , de los cuales el que tiene el mayor índice de marca es el adenoma secretor de GH, comparado con los adenomas que además de secretar GH también secretaban otras hormonas como FSH o PRL. El índice promedio de VEGF para estos adenomas fue de  $24.8 \pm 7.7$  y el de su receptor Flk-1 fue de  $30.6 \pm 5.5$  y por ultimo la evaluación de CD-34 fue de  $7.7 \pm 2.6$  (Tabla 9).

No	CLASIFICACIÓN		Ki-67 % $\pm$ DS	Flk-1 % $\pm$ DS	VEGF % $\pm$ DS	CD-34 % $\pm$ DS
13	CF	ACTH	++	+	$32.9 \pm 2.7$	$12.2 \pm 2.3$
16	CF	GH-FSH	$1.9 \pm 0.9$	$35.8 \pm 8.2$	$17.2 \pm 3.5$	$7.0 \pm 2.3$
17	CF	PRL-GH-FSH	$5.3 \pm 1.8$	$33.0 \pm 9.6$	$17.0 \pm 1.7$	$6.5 \pm 1.9$
32	CF	ACTH-GH	$6.1 \pm 2.4$	$23.0 \pm 2.9$	$32.4 \pm 4.2$	$5.3 \pm 1.3$
X $\pm$ DS			$4.4 \pm 1.8$	$30.6 \pm 5.5$	$24.8 \pm 7.7$	$7.7 \pm 2.6$

*Tabla 9- Índice de marcaje expresado en porcentaje de los marcadores biológicos en adenomas clínicamente funcionantes. CF= Clínicamente Funcionantes; FSH= Hormona Folículo Estimulante; ACTH= hormona adrenocorticotropica; GH=hormona del crecimiento; PRL= Prolactina; GH=hormona del crecimiento; + = reacción baja; ++ = reacción media; DS= desviación estándar.*

## OBSERVACIONES DE ULTRAESTRUCTURA

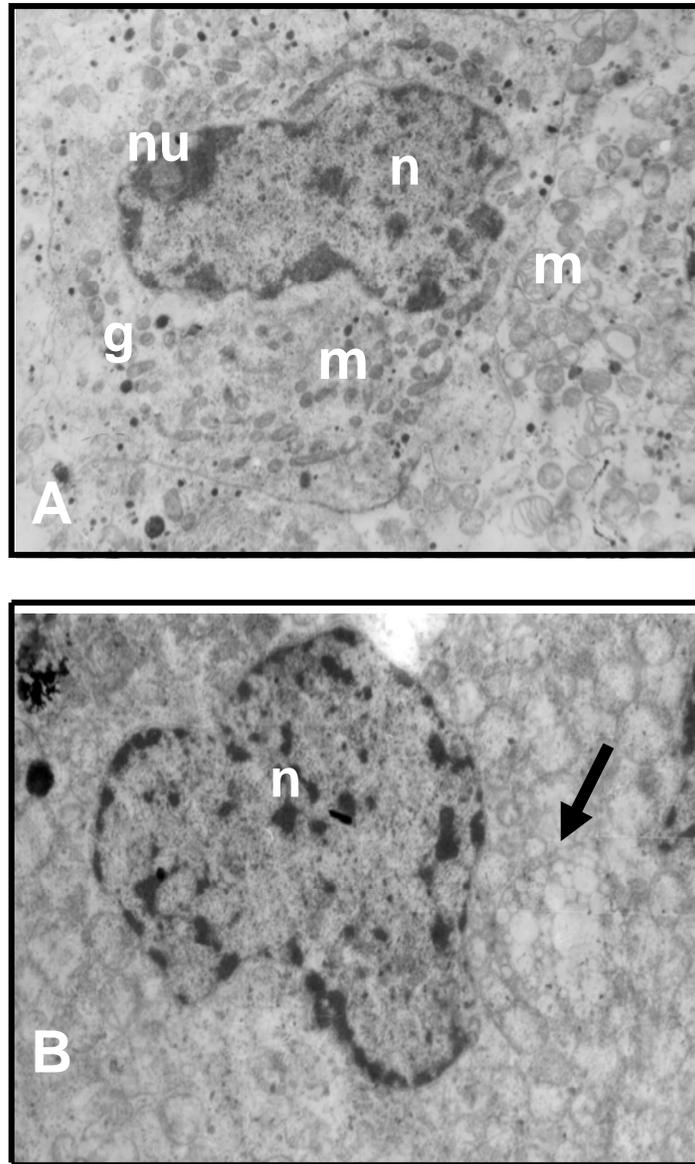
Al microscopio electrónico se analizó la ultraestructura de una muestra de hipófisis normal obtenida de autopsia y de los diferentes adenomas hipofisarios. El análisis de la hipófisis normal mostró células con límites celulares nítidos y abundantes gránulos de secreción, producto de su actividad hormonal (Figura. 3).



*Figura. 3 Micrografía electrónica de hipófisis normal humana, obtenida de autopsia, en la que se muestra una célula con numerosos gránulos de secreción (g), membrana celular conservada (m) y núcleo celular (n). Acetato de Uranilo-Citrato de Plomo, 7,154X.*

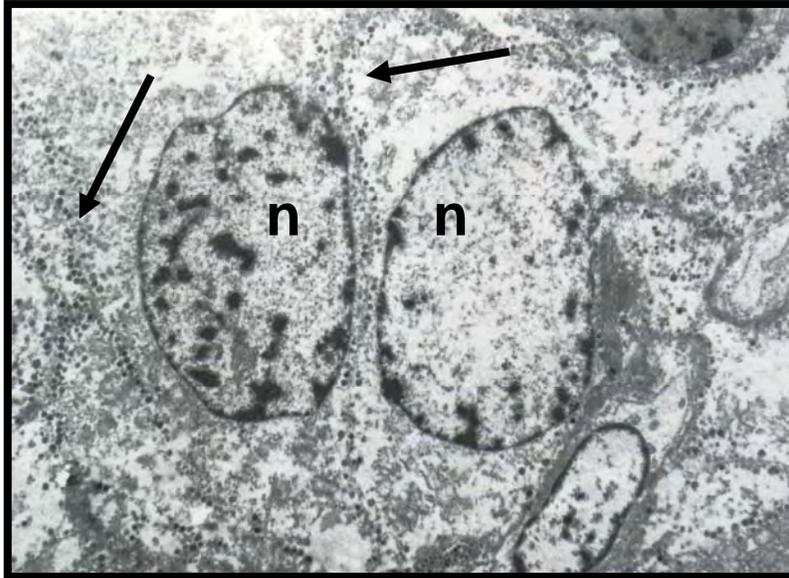
### **ADENOMAS CLÍNICAMENTE NO FUNCIONANTES**

Los adenomas secretores de gonadotropinas (FSH, LH) mostraron células alargadas con límites celulares definidos; citoplasma con escasos gránulos de secreción de pequeño tamaño, numerosos ribosomas libres, retículo endoplásmico rugoso en tramos cortos, lisosomas escasos, en algunos casos se observó aparato de Golgi bien desarrollado el cual mostró un arreglo en complejos conocido como en “panal de abejas”; que es el marcador característico de este tipo de neoplasias en mujeres. Los núcleos mostraron formas redondeadas con cromatina fina y nucléolos discretos localizados hacia la periferia nuclear. Otra característica de estos tumores es la presencia de abundantes mitocondrias conocido como cambios oncocíticos (Figura. 4).



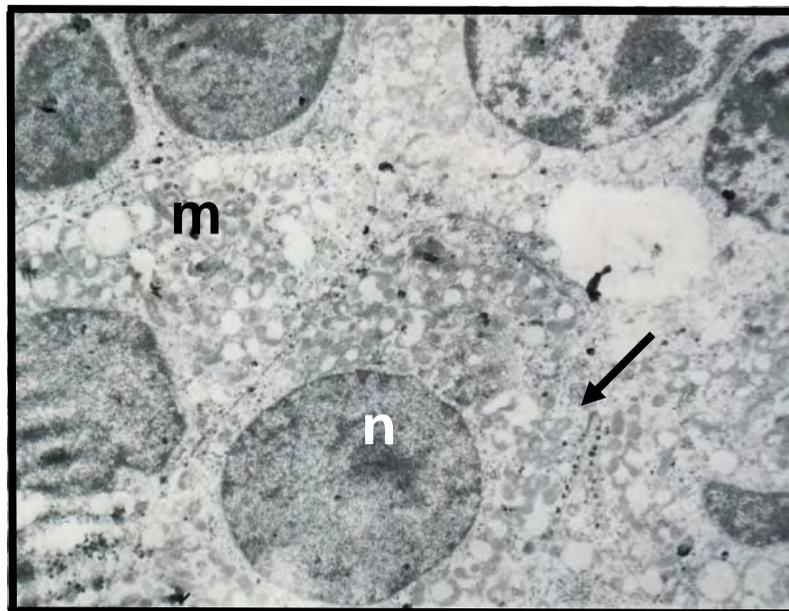
*Figura. 4 Micrográficas electrónicas de ADH no funcionantes secretoras de gonadotropinas en las que se muestran células con núcleo conservado (n) nucléolo localizado hacia la periferia nuclear (nu), complejo de Golgi vacuolado (flecha), mitocondrias (m) y escasos gránulos de secreción. Acetato de Uranino – Citrato de Plomo, 10,950 X.*

En el ADH mixto (caso 31, Tabla 1) se observaron células de núcleos ovalados con cromatina en grupos pequeños, nucléolo pequeño, citoplasma con gránulos de secreción localizados hacia la membrana celular, marcador característico de ADH productor de TSH, lo cual está de acuerdo con una de las hormonas detectadas en el citoplasma celular (Figura.5 ).



*Figura. 5 Micrografía electrónica de ADH clínicamente no funcionante productor de hormona estimulante de la tiroides. Se muestran núcleos celulares ovalados (n) y escasos gránulos de secreción pequeños, localizados hacia la membrana nuclear (flechas). Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo, 7,154 X.*

Los ADH no secretores mostraron células con escasos gránulos de secreción, ribosomas libres y mitocondrias (Figura. 6).



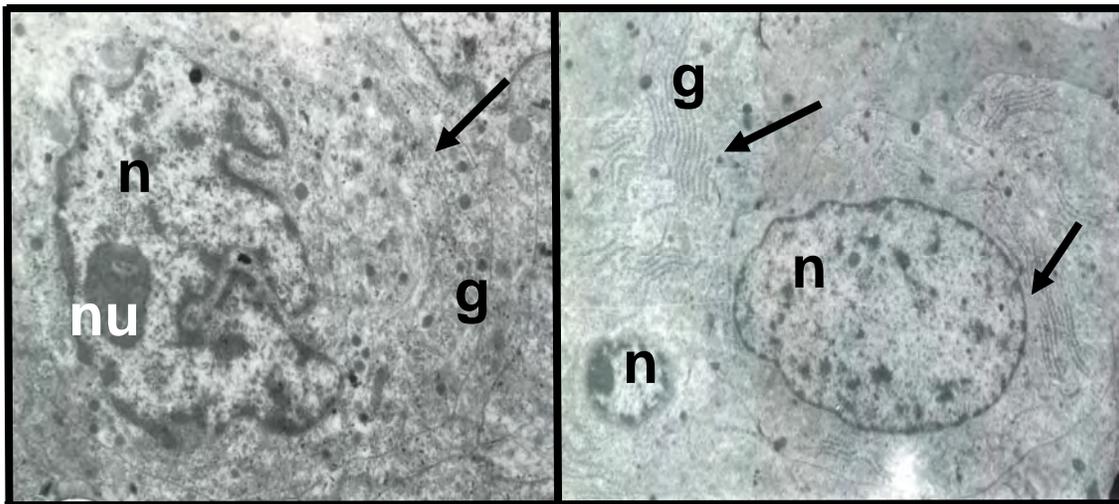
*Figura. 6 Micrografía electrónica de ADH no secretor que muestra pequeños y escasos gránulos de secreción (flecha) mitocondrias (m) y núcleos redondeados (n). Acetato de Uranilo – Citrato de Plomo, 10,950 X.*

### ADENOMAS CLINICAMENTE FUNCIONANTES

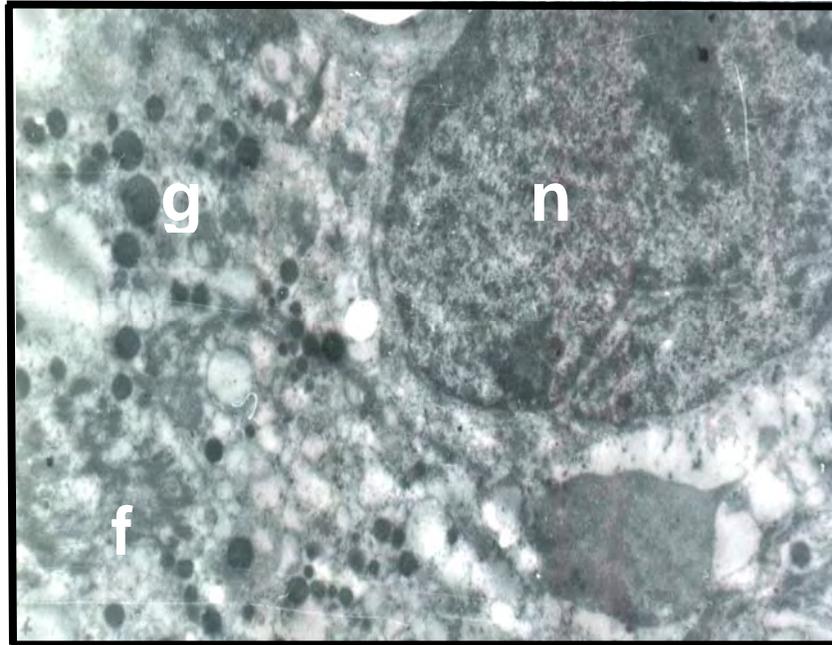
En los casos de ADH productores de prolactina se observaron células con gránulos de secreción grandes, retículo endoplásmico rugoso arreglado de forma lamelar, marcador morfológico de este tipo de adenomas; se pudieron además observar núcleos deformes (pleomórficos) y nucléolos grandes (Figura. 7).

En un caso de ACTH se observaron gránulos de secreción y grupos de haces filamentosos; marcador de estos tumores (Figura. 8).

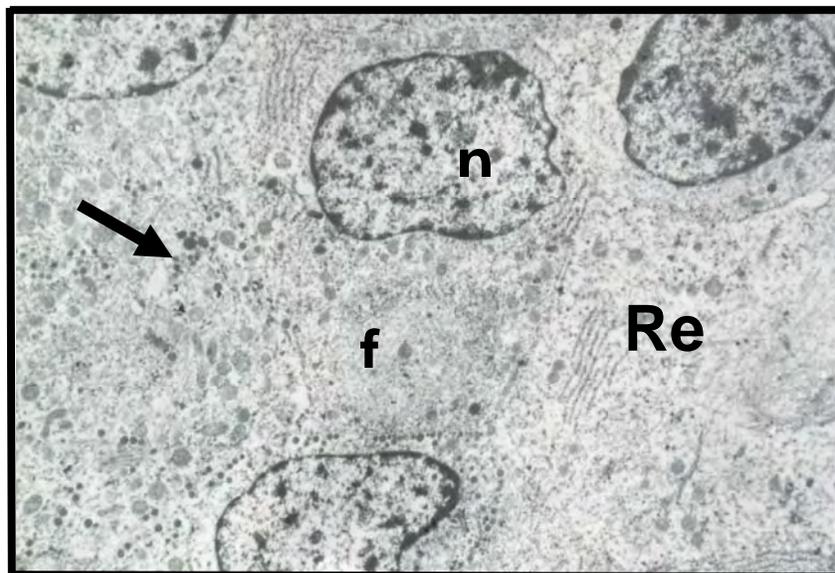
Los de hormona de crecimiento mostraron células de límites celulares bien definidos, gránulos de secreción, retículo endoplásmico rugoso lamelar y cuerpos fibrosos en su citoplasma, característica de este tipo de tumores (Figura. 9).



*Figura. 7 Micrografías electrónicas de ADH productor de prolactina en el que se observa núcleo deformado (n), con nucléolo (nu), retículo endoplásmico rugoso (flechas), escasos gránulos de secreción (g). Acetato de Uranilo – Citrato de plomo 14,016 X*



*Figura.8 Micrografía electrónica de ADH productor de ACTH caracterizado por la presencia de haces de filamentos (f), gránulos de secreción de tamaño heterogéneo (g) núcleo deformado (n). Acetato de Uranilo – Citrato de plomo, 14,016 X.*



*Figura.9 Micrografía electrónica de ADH productor de hormona de crecimiento, en la que se observa un cuerpo fibroso (f), núcleo (n), retículo endoplásmico rugoso (Re) y escasos gránulos de secreción (flechas). Acetato de Uranilo – Citrato de Plomo, 8,760 X.*

## MATERIAL RECUPERADO

Debido a la dificultad de obtener material suficiente para todas las pruebas, por las causas ya explicadas, el material incluido en parafina fue rescatado y procesado para ser observado por microscopía electrónica de transmisión, con el fin de evaluar la utilidad de este procedimiento.

En el material recuperado se pudieron observar células en su mayoría con núcleos íntegros con membrana conservada, cromatina en acúmulos pequeños, nucléolos de morfología conservada. En el citoplasma se pueden observar los gránulos de secreción, tramos cortos de retículo endoplásmico rugoso, restos distinguibles de mitocondrias, cuerpos de filamentos con gránulos de secreción marcador ultraestructural de un adenoma productor de hormona de crecimiento (Figura. 10). También se observaron casos en los que la conservación del tejido no fue muy buena, en los que las células no presentaron membrana íntegra, pero se pudo observar el contenido citoplásmico con gránulos de secreción.



*Figura.10 Micrografía electrónica de un ADH recuperado del bloque de parafina y procesado para microscopía electrónica de transmisión. Se observan restos de membrana celular (flecha), núcleos (n) y un cuerpo fibroso (f). Acetato de Uranilo – Citrato de Plomo, 8,760 X.*

## DISCUSIÓN

La génesis de los adenomas hipofisarios es controversial y en gran medida poco clara. Existen dos teorías principales de la etiología: La extrínseca (influencias hormonales) que sugiere que los adenomas hipofisarios son originados por las mismas hormonas adenohipofisarias que regulan las funciones de la hipófisis normal; o la intrínseca (alteraciones genéticas) como disfunción hipotalámica y por algunos factores de crecimiento que están involucrados en el desarrollo de la hipófisis fetal normal, además de mutaciones de algunos otros genes que están implicados (Tfelt-Hansen *et al.*, 2006; Yeung *et al.*, 2006).

Los adenomas hipofisarios se han clasificado de acuerdo a su actividad hormonal *in vivo*. Ezzat (2004) reportó que los adenomas secretores de PRL tuvieron mayor incidencia y los adenomas secretores de GH fueron considerados poco comunes. En el análisis de nuestros casos realizado por inmunohistoquímica, encontramos que para los adenomas clínicamente funcionantes hay mayor incidencia para los positivos a la GH, lo que nos lleva a tener diferencias con estudios previamente realizados por Ezzat (2004).

En el análisis de los adenomas clínicamente no funcionantes encontramos que hay una mayor incidencia de los adenomas secretores de gonadotropinas, lo cual coincide con lo reportado por Hanson (2005) quien encontró que existe mayor incidencia para las gonadotropinas a favor de FSH, esto es ahora ampliamente aceptado ya que los adenomas clínicamente no funcionantes son derivados de la proliferación de células de linaje gonadotropo que sintetiza LH o FSH y/o sus subunidades una denominada  $\alpha$  y otra denominada  $\beta$ , (Hanson, 2005). Además se encontró relación entre los adenomas positivos a las gonadotropinas con un alto riesgo de recurrencia o recaída después de la primera cirugía. Varios reportes sobre adenomas clínicamente no funcionantes sugieren que el riesgo de recurrencia depende del tamaño del tumor, invasividad y la extensión de la extirpación quirúrgica (Dubois, 2007).

## MARCADORES BIOLÓGICOS

El antígeno Ki-67 refleja la tasa de proliferación celular (Pizarro, 2004) ya que es un marcador que se presenta en todas las etapas del ciclo celular pero no en células en reposo ( $G_0$ ). Se han encontrado altos índices de marcaje en adenomas clínicamente no funcionantes, en adenomas recurrentes y en secretores de ACTH (Botelho, 2006; Shibuya, 1992; Mastronardi, 1999). Un alto índice de marcaje del Ki-67 sugiere que se necesita un cuidado clínico y seguimiento radiológico (Mastronardi *et al.*, 1999).

Landolt (1987) examinó la tasa de crecimiento de 31 adenomas hipofisarios. El rango del índice de marcaje del Ki-67 fue de 0.1-3.7 %, con altos valores en adenomas clínicamente funcionantes, especialmente en el tipo secretor de ACTH y en adenomas invasivos verificados radiológicamente, quirúrgicamente e histológicamente.

En este trabajo, el índice de marcaje para Ki-67 fue de  $4.4 \pm 1.8\%$  en ADH clínicamente funcionantes y de  $8.1 \pm 7.4\%$  para adenomas clínicamente no funcionantes. Esto refleja la actividad de proliferación celular y tendencia de crecimiento, lo que explica la recurrencia después de la cirugía y posible invasión. De los adenomas clínicamente no funcionantes el que presentó el mayor índice de marcaje para Ki-67 fue el secretor de FSH ( $7.1 \pm 4.9\%$ ) y el de menor índice fue el adenoma clínicamente no funcionante no secretor ( $3.5 \pm 1.8\%$ ), por lo tanto hay mas posibilidades de una recurrencia después de la cirugía en una adenoma secretor de FSH.

En adenomas clínicamente funcionantes el que presentó un mayor índice de marcaje para Ki-67 fue el adenoma secretor de GH ( $6.1 \pm 2.4\%$ ) lo que sugiere que hay mas probabilidades de crecimiento en un tumor de este tipo como lo sugiere Dubois (2007).

El PTTG-1 es un inhibidor de la anafase, que previene la separación prematura de las cromatidas hermanas a través de la inhibición de la actividad de la separasa, por lo tanto esta degradación es requerida para iniciar el anafase. A través de esta importante función el PTTG-1 participa en diversos procesos celulares incluyendo la mitosis, progresión del ciclo celular, reparación del DNA, apoptosis y tumorigénesis, ya que sirve como marcador en diversas formas de cáncer particularmente en malignidades endocrinas como los adenomas hipofisarios, porque se encuentra en niveles elevados en diversos tumores analizados en comparación con tejidos normales. El PTTG-1 induce la aneuploidia celular (un cambio genético que involucra la pérdida o la adición de cromosomas por problemas en el proceso de la división celular. Los cromosomas replicados pueden no separarse correctamente en las células hijas, lo que puede resultar en células que tengan demasiados cromosomas o muy pocos), frecuentemente notada en cánceres humanos. Las alteraciones en el número de cromosomas es debido a los defectos en un mecanismo de vigilancia del ciclo celular a cargo de proteínas de seguridad llamadas también checkpoint, resultando una inestabilidad cromosomal. El PTTG-1 es un checkpoint mitótico involucrado en la transición de la metafase-anafase (Tfelt-Hansen, 2006; Cristina, 2007).

El PTTG-1 tiene un papel doble en la tumorigénesis: primero como regulador clave de la división celular, el cual inicia la inestabilidad genética y segunda, como un transactivador de factores de crecimiento. Una expresión alta del PTTG-1 induce al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y otros genes pro-angiogénicos. (Tfelt-Hansen, 2006). La angiogénesis se define como el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes, inducido en el caso de las neoplasias, por las propias células tumorales. Éste es un proceso necesario en el crecimiento tumoral, que permite no sólo el aporte de oxígeno y nutrientes, sino además el paso de células neoplasias al torrente circulatorio para su diseminación a distancia (Palomero, 2004).

La existencia de actividad angiogénica en los tejidos tumorales se puede demostrar a través de la detección de moléculas angiogénicas o bien por el descubrimiento de la propia trama neovascular. Por ello, el estudio de la angiogénesis se puede abordar de dos formas: la cuantificación de la densidad microvascular y el análisis inmunohistoquímico de los niveles de los diferentes factores estimuladores/inhibidores de la angiogénesis (Palomero *et al.*, 2004) Por lo tanto, el PTTG-1 aparece como iniciador y promotor de la tumorigénesis (Tfelt-Hansen, 2006) y resulta central para la hiperplasia hipofisiaria y la formación del adenoma. Se ha demostrado en estudios realizados por Hunter, (2003) y McCabe (2003), que existe una expresión mayor del PTTG-1 en somatotropos, adrenocorticotropos y en adenomas clínicamente no funcionantes, en comparación con otros adenomas hipofisarios secretores de otras hormonas (Tfelt-Hansen, 2006; Cristina, 2007).

El índice de marcaje del PTTG-1 es de  $29.5 \pm 20.0$  % para adenomas clínicamente no funcionantes, esto proporciona la capacidad de estimular los fibroblastos para producir el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e inducir la angiogénesis en el adenoma hipofisiario. En adenomas secretores de gonadotropinas se encuentran los niveles más elevados de PTTG-1, por lo cual estos adenomas son más susceptibles a la angiogénesis.

La alta sensibilidad del PTTG-1 como un marcador de adenomas hipofisarios puede deberse al hecho que esta proteína participa en la transición de células normales a tumores benignos como es el caso de adenomas hipofisarios (Tfelt-Hansen, 2006).

El sistema vascular intratumoral es importante para suministrar a las células tumorales nutrientes y oxígeno y para eliminar residuos. El brote de vasos dentro de un tumor en expansión es un proceso complejo que involucra proliferación

celular endotelial, formación de tubos vasculares así como degradación de la matriz tumoral e invasión durante la remodelación basal (Onofri, 2006).

El VEGF es un polipéptido sintetizado y secretado por una variedad de células normales y tumorales, está presente específicamente en células endoteliales vasculares teniendo un papel importante como promotor angiogénico por la estimulación de proliferación celular, migración y mejorando la permeabilidad vascular. Su actividad biológica es medida principalmente por los receptores VEGFR2 o Flk-1/KDR (por sus siglas en inglés, fetal liver kinase-1/kinase insert domain-containing receptor) y VEGFR1 o Flt-1 (por sus siglas en inglés, fms-like tyrosine kinase). Se ha sugerido que ambos receptores tienen un papel diferente en la angiogénesis y en la vía de transducción de señales. El Flk-1/KDR específicamente une al VEGF en las células vasculares endoteliales y existe evidencia reportada de un bucle autócrino entre el VEGF y Flk-1 en células neoplásicas y esto es apoyado porque se han encontrado altos niveles de estas proteínas en adenomas hipofisarios específicamente en adenomas clínicamente no funcionales (Niveiro, 2005).

Niveiro (2005) encontró altos niveles de VEGF predominantemente en casos de pacientes con edad avanzada y con adenomas clínicamente no funcionales y otros autores como Viacava (2003) no encontró relación alguna entre la expresión del VEGF y el tamaño del tumor, sexo, edad, tasa de recurrencia y tipo histológico.

McCabe en 2002 demostró, en una serie de 103 adenomas hipofisarios, que se incrementó el mRNA de Flk-1 y concentraciones de proteína comparado con tejido normal (Niveiro, 2005).

Para los marcadores angiogénicos se encontró un índice de marcaje de  $22.9 \pm 19.0\%$  y  $35.8 \pm 25.3\%$  para Flk-1 y VEGF respectivamente en adenomas clínicamente no funcionales; y de  $30.6 \pm 5.5\%$  y  $24.8 \pm 7.7\%$  para Flk-1 y VEGF

respectivamente para adenomas clínicamente funcionantes, lo que nos sugiere que en adenomas clínicamente no funcionantes puede existir una mayor capacidad para generar nuevos vasos sanguíneos y así tener un mejor suministro de nutrientes y oxígeno necesarios para la proliferación celular del adenoma.

De manera general, las neoplasias se caracterizan por un alto grado de densidad microvascular (MVD), la cual es esencial para el crecimiento vascular y la metástasis; mientras que los adenomas hipofisarios tienen menos vascularidad que la hipófisis normal. Con base en ello se sugiere que los inhibidores angiogénicos pueden jugar un papel importante en el comportamiento de estos tumores. Por otra parte la vascularidad detectada en adenomas hipofisarios puede ser debido a una irrigación sanguínea de forma completa o parcial del sistema extraportal (Niveiro *et al.*, 2005) (Figura. 4).

Estudios morfológicos han revelado el complejo suministro sanguíneo de la hipófisis. Mientras que la neurohipófisis es directamente irrigada por las arterias hipofisarias inferiores, la adenohipófisis es irrigada principalmente por las arterias hipofisarias superiores a través del sistema portal largo y por las arterias hipofisarias inferiores a través del sistema portal corto. La irrigación sanguínea arterial de la adenohipófisis puede también venir de arterias capsulares originarias de la arteria carótida interna (Kristof *et al.*, 2003).

La densidad microvascular y la densidad microvascular de la superficie fueron mayores en la adenohipófisis que en la neurohipofisis. Edad, sexo o embarazo no afectan la angioarquitectura en esos sitios. No hay diferencias significativas entre la densidad microvascular y densidad microvascular de la superficie observada en el centro y zonas laterales del lóbulo aunque la densidad microvascular fue menor en las zonas laterales. Una marcada diferencia fue observada en la vascularidad de microadenomas comparado con tejido no tumoral. La densidad microvascular y la densidad microvascular de la superficie fueron significativamente inferiores en tejido adenomatoso (Vidal *et al.*, 2000).

La falta significativa de la angiogénesis en adenomas hipofisarios puede ser la base de la baja tasa de crecimiento y la poca frecuencia de metástasis en estos tumores (Vidal *et al.*, 2000). Vidal *et al.*, 2001 encontró que el porcentaje más bajo de la densidad microvascular fue en adenomas productores de GH y el nivel más alto en los carcinomas. En este estudio en general no se encontró correlación entre el índice de MIB-1 (un indicador de proliferación celular) y la densidad microvascular.

También demostró que no existen cambios que dependan del género en la densidad microvascular de adenomas hipofisarios. Aunque la densidad microvascular no presenta diferencias significativas en relación con la invasividad del tumor sus resultados demostraron una tendencia de tumores hipofisarios invasivos a estar más altamente vascularizados que los no invasivos (Vidal, 2001). Fueron encontradas diferencias estadísticas en la densidad microvascular de macroadenomas entre pacientes mayores de 40 años y pacientes menores de 40 años. Diferencias significativas fueron también aparentes en la densidad microvascular entre micro y macroadenomas diagnosticados en pacientes jóvenes pero no en un grupo de personas mayores. Se encontró una fuerte correlación entre la densidad microvascular tumoral y la edad del paciente, en la opinión de que la edad de los receptores puede influir en la medida de una nueva vascularización de adenomas hipofisarios (Vidal *et al.*, 2001).

Los vasos neoformados se caracterizan por presentar unas células endoteliales de carácter neoplásico, con un índice de proliferación aumentado, que puede llegar a ser de hasta 50 veces, células que configuran una red de microvasos que permite la invasividad y las metástasis. Para la identificación y estudio de estos neovasos es necesario primero su tinción con anticuerpos específicos (Palomero *et al.*, 2004). En el presente trabajo se utilizó el anticuerpo CD-34 ya que marca específicamente las células endoteliales. El índice de marcaje para CD-34 en adenomas clínicamente no funcionantes fue de  $11.4 \pm 4.8$  % y para los adenomas clínicamente funcionantes fue de  $7.75 \pm 2.6$  %. La falta de

CD-34 en el endotelio de los vasos sanguíneos puede sugerir que una vez que el tejido se ha poblado pierde su capacidad de una futura migración.

Los adenomas hipofisarios están constituidos por un grupo de neoplasias diversas debido a la actividad endocrina de la glándula. Por otro lado, son un tipo de tumores difíciles de abordar quirúrgicamente, por lo que con frecuencia no es posible, para el neurocirujano, obtener suficiente cantidad de tejido en buenas condiciones para poder ser sometido a las diversas pruebas histológicas, inmunohistoquímicas y de microscopía electrónica. Es por esto, que se desarrolló un procedimiento histológico de recuperación del tejido incluido en parafina, para ser procesado para microscopía electrónica de transmisión, incluido en una resina hidrofílica (LR-White). Esta técnica demostró ser útil para poder analizar este tipo de tumores, ya que se conservan los elementos morfológicos esenciales para poder identificar a los ADH, como son los gránulos de secreción, retículo endoplásmico y presencia de filamentos como es el caso de los de la hormona de crecimiento.

## CONCLUSIÓN

Los adenomas hipofisarios son un grupo heterogéneo de neoplasias que presenta una diversa y complicada actividad endocrina, por eso es importante aplicar diferentes técnicas histopatológicas para determinar, de manera más precisa, su clasificación, su actividad secretora, su actividad proliferativa y realizar un mejor diagnóstico.

En el presente trabajo se observó que:

La técnica de inmunohistoquímica proporcionó la información específica y confiable de la actividad secretora, lo cual permitió realizar la clasificación de este tipo de tumores, además con esta misma técnica, se averiguó la actividad proliferativa utilizando los anticuerpos indicados.

La microscopia electrónica, mostró las características morfológicas ultraestructurales específicas para cada tipo de adenoma hipofisario, permitiendo realizar la interrelación con la actividad secretora, obtenida con la inmunohistoquímica.

La técnica de recuperación de tejidos desarrollada, mostró ser una opción aceptable para analizar a los adenomas hipofisarios al microscopio electrónico de transmisión, en aquellos casos en los que no es posible procesar los tejidos directamente para microscopia electrónica.

## ANEXOS

### 1.- FORMALDEHIDO AL 10%

10 ml de formaldehído

90 ml de agua destilada.

### 2. PROCESAMIENTO DE LAS BIOPSIAS

- Alcohol al 70 % 2 cambios de 1 h cada uno
- Alcohol al 80 % 2 cambios de 1 h cada uno
- Alcohol al 96 % 2 cambios de 1 h cada uno
- Alcohol absoluto 2 cambios de 1 h cada uno
- Xilol al 100 % 2 cambios de 1 h cada uno
- Baño de parafina 2 cambios de 1 h cada uno

### 3.- SILANIZADO DE LAMINILLAS

Silano al 2%

245 ml de acetona

5 mL de silano

1.- 2 minutos en silano

2.- 2 minutos en agua

3.- 2 minutos en agua

4.- Dejar secar en un horno a 60 °C

### 4.- TINCIÓN POR HEMATOXILINA-EOSINA

A- Desparafinar en dos cambios de Xilol por 15 minutos cada uno

B- Hidratar

- OH 100% x 3 min.
- OH 100% x 3 min.
- OH 96% x 3 min.
- OH 96% x 3 min.

- OH 80% x 3 min.
- Enjuagar con H<sub>2</sub>O destilada

#### C- Tinción con Hematoxilina-Eosina

- Hematoxilina x 3 min.
- Enjuagar con H<sub>2</sub>O destilada.
- Virar con LiCO<sub>2</sub>.
- Enjuagar con H<sub>2</sub>O destilada.
- Eosina x 3 min.

#### D- Deshidratar

- OH 80% x 3 min.
- OH 80% x 3 min.
- OH 96% x 3 min.
- OH 96% x 3 min.
- OH 100% x 3 min.
- OH 100% x 3min
- OH-Xilol (50-50) x 3 min.
- Xilol x 3 min.
- Xilol x 3 min.
- Xilol x 3min.
- Montar laminillas en resina entellan

## 5. INMUNOHISTOQUÍMICA DE ADENOMAS HIPOFISIARIOS

### Preparación de PBS 0.1M pH 7.4

SOLUCIÓN CONCENTRADA (2x)

Sol. A. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O 27.598 g

H<sub>2</sub>O 1000 ml

Sol. B NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro 28.39g

H<sub>2</sub>O 1000 ml

**SOLUCIÓN DE TRABAJO**

Agregar sol A a la B, poco a poco hasta obtener pH 7.4. Diluir la solución por partes iguales (1:1) con agua destilada y agregar 0.8 g de NaCl por cada 100 ml.

**PBS-Tritón al 0.1%**

50 µL de Tritón

50 mL de PBS al 0.1 M pH 7.4

**Peróxido de hidrógeno 0.3%**

50 ml de agua destilada

400 µl de peróxido de hidrogeno al 30%.

**Solución stock de albúmina bovina al 1%**

1 gr. de albúmina bovina

100 ml de PBS

**Recuperación de sitios antigénicos**

A- Desparafinar en dos cambios de Xilol por 15 minutos cada uno

B- Hidratar

- OH 100% x 3 min.
- OH 100% x 3 min.
- OH 96% x 3 min.
- OH 96% x 3 min.
- OH 80% x 3 min.
- Enjuagar con H<sub>2</sub>O destilada

C- Se sumergen las laminillas en solución recuperadora (Biocare Medical 10X reveal) en proporción: 1 parte de recuperador por 9 partes de agua desionizada por 7 min. en una olla de presión (Nacional Pressure Cooker SR-206N)

D- Enjuagar con agua destilada 2 lavados por 5 min. c/u

### **Inmunohistoquímica**

- 1- Cortes montados en laminillas con silano
- 2- Desparafinar en dos cambios de 15 minutos cada uno e hidratar hasta agua destilada
  - OH 100% x 3 min.
  - OH 100% x 3 min.
  - OH 96% x 3 min.
  - OH 96% x 3 min.
  - OH 80% x 3 min.
  - Enjuagar con H<sub>2</sub>O destilada
- 3- Se realizan lavados con solución PBS 1 x 3 min.
- 4- Bloquear con peroxidasa endógena en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 min. (400µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% en 50µl de H<sub>2</sub>O destilada)
- 5- Enjuague con PBS 3min.
- 6- Bloquear sitios antígenos inespecíficos con albúmina bovina (Albumin Bovine SIGMA, Steinheim, Germany) al 0.2% por 20 min. (para 1 ml: 200µl sol stock de BSA al 1% + 800µl de PBS).
- 7- Enjuague en PBS x · min.
- 8- Enjuague con PBS-Triton al 0.1% 2 lavados x 3 min.
- 9- Incubar con el anticuerpo primario 1 h a temperatura ambiente
  - PRL, listo para usarse
  - GH, listo para usarse
  - FSH, listo para usarse
  - LH, listo para usarse
  - TSH, listo para usarse
  - ACTH, listo para usarse
  - PTTG-1, solución 1:100

- Ki-67, solución 1:100
- VEGF solución 1:50
- FLK-1, solución 1:50
- CD 34, listo para usarse

10-Enjuague en PBS-Triton 2 lavados x 3 min.

11-Incubar con el anticuerpo secundario (multilink) biotinado por 20 min.

12-Enjuague PBS-Triton 2 lavados x 3 min.

13-Incubar con streptavidina peroxidasa por 20 min.

14-Enjuague PBS- Triton 2 lavados x 3 min.

15-Incubar con sustrato DAB por 5 min.

16-Enjuagar con H<sub>2</sub>O destilada por 5 min.

17-Contrateñir ligeramente con Hematoxilina por 2 min.

- Enjuagar con H<sub>2</sub>O destilada (2 lavados)
- Contrastar ligeramente con Carbonato de Litio (virar)
- Enjuagar

18-Deshidratar.

- OH 80%
- OH 96% (2 Lavados)
- OH 100% (2 Lavados)
- OH-Xilol
- Xilol (3 cambios)
- Montar las laminillas en resina entellan
- 

### **Preparación de DAB**

- 100µl de Buffer 10X
- 900µl de H<sub>2</sub>O desionizada
- 16µl de cromógeno (DAB)
- 8µl de peróxido de hidrogeno

**6.- Microscopía electrónica**

- 1- Se rescata el material del bloque de parafina
- 2- Se colocan en Xilol por 24 h.
- 3- Se colocan en alcohol absoluto por 24 h
- 4- Preinclusión en una mezcla de OH absoluto y resina hidrofílica LR-White

**OH absoluto : resina LR-White**

2 : 1            x 3 h.

1 : 1            x 3 h.

1 : 2            x 3 h.

Resina pura (3 cambios de 1h. c/u)

- 5- Inclusión en resina LR-White en cápsulas de gelatina
- 6- Polimerizar a 60° C de 12-18 h
- 7- Realizar cortes a 1µm
- 8- Teñir con azul de toluidina
- 9- Observar en el microscopio óptico
- 10-Realizar cortes finos seriados a 60 nm
- 11-Contrastar con Ur-Pb
- 12-Observar en el microscopio electrónico de transmisión.

**Azul de Toluidina**

Azul de toluidina 1 g

Tetraborato de sodio (Borax) 1g

Agua destilada 100 ml

**Acetato de uranilo 3%**

- Acetato de Uranilo 300 mg
- Agua bidestilada 10 ml
- Disolver el uranilo en agua.
- Ajustar el pH a 4.5 con NaOH 10 N (0ñ.4 g de NaOH en 10 ml)

- Centrifugar por 10 min a 300 rpm
- Guardar a 4° en oscuridad

### **Citrato de Plomo**

- Citrato de Plomo 30 mg
- Agua bidestilada 10 ml
- Disolver el plomo en agua bidestilada hervida por varios minutos y fría, agitar por varios minutos y agregar NaOH 10 N hasta aclarar y que obtenga un pH de 12. Centrifugar por 10 min, guardar a 4° en oscuridad.

## **7.- PROCESAMIENTO EN RESINA HIDROFÓBICA**

### **Amortiguador de Cacodilatos al 0.1 M pH 7.2**

Ácido Cacodílico 4.06 g

Agua bidestilada 100 ml

Ajustar el pH a 7.2 con HCl 1:1 en agua destilada.

### **Glutaraldehído al 2.5%**

Glutaraldehído al 25%      10 ml

Amortiguador de Cacodilatos al 0.1 M pH 7.2                      90 ml

### **TETRAOXIDO DE OSMIO AL 1%**

Tetraóxido de Osmio      1g

Amortiguador de cacodilatos 0.1 M pH 7.2      10 ml

Verter el tetraóxido de osmio junto con la ampolla perfectamente limpia, en 100 ml del amortiguador, en un recipiente muy limpio. Agitar suavemente y dejar disolver por 24 hr antes de usarlo. Cubrir el recipiente con papel aluminio y guardar a 4° C.

**PROCEDIMIENTO**

- 1.- Fijar por 1h fragmentos de tejido de 3 mm<sup>3</sup> en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos 0.1M pH 7.2
- 2.- Enjuagar en amortiguador de Cacodilatos por 10 min
- 3.- Postfijar por 1 h en tetraóxido de osmio al 1%, preparado en el mismo amortiguador.
- 4.- Enjuagar en amortiguador de Cacodilatos por 10 min
- 5.- Deshidratar en alcoholes de concentración gradual ascendente:
  - Alcohol 70 % 10 min
  - Alcohol 80% 10 min
  - Alcohol 90% 10 min
  - Alcohol 100% dos cambios de 10 minutos cada uno
  - Óxido de Propileno dos cambios de 10 min cada uno
- 6.- Preincluir en una mezcla 1:1 de óxido de propileno – resina epóxica por 18 h a temperatura ambiente
- 7.- Incluir en resina epóxica al 100%
- 8.- Polimerizar por 18 h a 60°C

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Agrawal A, Cincu R, Goel A. (2007). Current concepts and controversies in the management of non-functioning giant pituitary macroadenomas. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 109: 645-650.
2. Allen TC. (1992). *Hematoxilina y eosina*, Prophet EB Arrington JB, Sobin LH. eds *Métodos histotecnológicos Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) Washington, DC.*, pp. 55-60.
3. Amar AP, Weiss MH. (2003) Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am.* 13:11-23.
4. Al-Shiram M, Asa SL. (2006). The 2004 World health Organization classification of pituitary tumors: What is new? *Acta Neuropathologica* 111:1-7.
5. Arafah BM, Nasrallah MP. (2001). Pituitary Tumors: Pathophysiology clinical manifestation and management. *Endocrine-Related Cancer* 8: 287-305.
6. Aron DC, Findling JW, Tyrell JB. (1997) *Hypothalamus and pituitary*. Greenspan FS, Strewler DG, eds. *Basical and clinical Endocrinology*, 5 Ed. Stamford: Appleton and Lange., pp 95-156.
7. Aron DC, Findling JW, Tyrell JB. (2005). *Hipotálamo e Hipófisis*. Greenspan FS, Strewler DG, eds. *Endocrinología Básica y Clínica* 6° edición Ed. Medica Panamericana México DF., pp 129-176.
8. Asa SL. (1994). Diseases of the Pituitary. *Neuropathology Neurosurgery Clinics of North America* 5(1): 71-95.

9. Asa SL, Ezzat S. (1998). The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocrine Reviews* 19(6): 798-827.
10. Astorga R, Acosta D. (2003). *Adenomas Hipofisarios no Funcionantes (AHNF)*. Jara A. eds *Endocrinología*. Ed. Medica Panamericana México D.F., pp103-107.
11. Bilbao JM. (1996). *Pituitary Gland* Rosai J eds *Ackerman's Surgical Pathology* 8º edición Vol. 2 Ed. Mosby, New York., pp. 2415-2433.
12. Boelaert K, McCabe CJ, Tannahill LA, Gittoes NJ, Holder RL, Watkinson JC, Bradwell AR, Sheppard MC, Franklyn JÁ. (2003). Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 2341–2347.
13. Boelaert K, Yu R, Tannahill LA, Stratford AL, Khanim FL, Eggo MC, Moore JS, Young LS, Gittoes NJL, Franklyn JA, Melmed S, McCabe CJ. (2004) PTTG's C-terminal PXXP motifs modulate critical cellular processes *in Vitro*. *Journal of Molecular Endocrinology* 33: 663–677.
14. Borg SA, Kerry KE, Royds JA, Battersby RD, Jones TH. (2005). Correlation of VEGF production with IL1 $\alpha$  and IL6 secretion by human pituitary adenomas cells. *European Journal of Endocrinology* 152: 293-300.
15. Botelho CHA, Verçosa de Magalhães A, Andrade de Mello P, Schmitt F, Casulari LA. (2006). Expression of P53, KI-67 and C-ERB B2 in Growth Hormone and/or prolactin-secreting Pituitary Adenomas. *Arq. Neuropsiquiatria* 64(1): 60-66.

16. Castillo M. (2005). Pituitary gland: Development, Normal appearances, and magnetic resonance imaging protocols. *Top Magn Reson Imagin* 16(4): 259-268.
17. Chandrasoma P, Taylor CR. (1994) *Hipófisis*, Patología General Ed. El Manual Moderno, México DF., pp. 891-895.
18. Ciccanelli A, Daly AF, Beckers A (2005). The Epidemiology of Prolactinomas. *Pituitary* 8: 3-6.
19. Colao A, Sarno AD, Cappabianca P, Briganti F, Pivonello R, Somma CD, Faggiano A, Biondi B, Lombardi G (2003). Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in the hyperprolactinemia. *European Journal of Endocrinology* 148: 325-331.
20. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. (1941). Immunological properties of an antibody containing fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 47:200.
21. Cristina C, Diaz-Torga GS, Goya RG, Kakar SS, Perez-Millan MI, Passos VQ, Giannella-Neto D, Bronstein MD, Becu-Villalobos D. (2007). PTTG expression in different experimental and human prolactinomas in relation to dopaminergic control of lactotropos. *Molecular Cancer* 6: 4.
22. Delgrange E, Trovillas J, Maiter D, Donckier J, Tourniaire (1997). Sex-related difference in the growth of prolactinomas: a clinical and proliferation marker study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82: 2102-2107.
23. Dorton AM. (2000). The pituitary gland: embryology, physiology and pathophysiology. *Neonatal Netw.* 19(2):9-17.

24. Drange MR, Fram NR, Herman-Bonert V, Melmid S. (2000). Pituitary Tumor registry a novel clinical resource. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85:168-174.
25. Drew E, Huettner CS, Tenen DG, McNagny KM (2005). CD34 Expression by mast cells: of mice and men. *Blood* (106)5: 1885-1887.
26. Dubois S, Guyétant S, Menei P, Rodien P, Illouz F, Vielle B, Rohmer V. (2007). Relevance of KI-67 and prognostic factors for recurrence/progression of gonadotropic adenomas after first surgery. *European Journal of Endocrinology* 157:141-147.
27. Elster AD. (2003). Modern imaging of the pituitary. *Radiology*. 187:1-14.
28. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Lee Vance M, McCutcheon IE. (2004). the Prevalence of Pituitary Adenomas. *American Cancer Society* 101(3): 613-619.
29. Ganong WF. (2004). *Hipófisis*, Fisiología Médica 19º edición Ed. El Manual Moderno México DF., pp 433-448.
30. Gray H. (2000). *Anatomy of the Human Body* 20º Edition. Bartleby New York.
31. Halasz B. (1994). Hypotalamo-anterior pituitary portal vessels. Imura H, ed. *The pituitary gland*, 2º edición. New Cork, Raven Press :1-29.
32. Hanson PL, Aylwin SJB, Monson JP, Burrin JM. (2005). FSH secretion predominates *in vivo* and *in vitro* in patients with non-functioning pituitary adenomas. *European Journal of Endocrinology* 152: 363-370.

33. Horvath E, Kovacs K, Singer W, Smyth HS, Killinger DW, Ezriin C. (1981). Acidophil Stem Cell Adenoma of the Human Pituitary. Clinico-Pathological Analysis of 15 cases. *Cancer* 47:761-771.
34. Hunter JA, Skelly RH, Aylwin SJ, Geddes JF, Evanson J, Besser GM, Monson LP, Burrin JM.(2003). The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas. *European Journal Endocrinology* 148:203-211.
35. Jaffain-Rea ML, Di Stefano D, Minniti G, Esposito V, Bultrini A, Ferretti E, Santoro A, Faticanti Scucchi L, Gulino A Cantore G. (2002). A critical reappraisal of MIB-1 labeling index significance in a large series of pituitary tumors: secreting versus non-secreting adenomas. *Endocrine-Related Cancer* 9:103-113.
36. Jara A. (2003). *Adenohipófisis. Hormonas. Exploración general. Patología.* Endocrinología Ed. Médica Panamericana México DF., pp 39-43.
37. Kontogeorgos G. (2005). Classification and pathology of pituitary tumors. *Endocrine* 28(1): 27-35.
38. Kontogeorgos G. (2006). Predictive markers of pituitary adenoma behavior. *Neuroendocrinology* 83(3-4):179-188.
39. Kovacs K, Horvath E, Vidal S. (2001). Classification of pituitary adenomas. *Journal of Neuro-Oncology* 54 (2):121-127.

40. Kristof RA, Aliashkevich AF, Han V, Haun D, Meyer B, Thees C, Schramm J. (2003). The regional oxygen saturation of pituitary adenomas is lower than that of the pituitary gland: Microspectrophotometric study with potential clinical implications. *Neurosurgery* 53:880-886.
41. Lack EA, Farber JL, Rubin E. (2001). *The endocrine System*. Rubin E. eds Essential Pathology 3<sup>o</sup> edición Ed. Lippincott Williams and Wilkins, pp 595-599.
42. Landolt AM, Shibata T, Kleihues P. (1987). Grow rate of human pituitary adenomas. *Journal of Neurosurgery* 67: 803-806.
43. Maitra M, Abbas AK. (2005). *El Sistema Endocrino* Kumar V, Abbas AK, Fausto N eds. *Robbins y Cortai* Patología estructural y funcional 7<sup>o</sup> edición Ed. Elsevier Madrid, España, pp 1159-1166.
44. Mastronardi L, Guiducci A, Spera C, Puzzilli F, Liberati F, Maira G. (1999). KI-67 labelling index and invasiveness among anterior pituitary adenomas: analysis of 103 cases using the MIB-1 monoclonal antibody. *Journal of clinical pathology*; 52:107-111.
45. Mastronardi L, Guiducci A, Puzzilli F. (2001) Lack of correlation between KI-67 labelling index and tumor size of anterior pituitary adenomas. *BMC Cancer* 1:12-16.
46. McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, Hussain S, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittoes NJ. (2002). Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Fik-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 4238–4244.

47. Morrison P, Takishima K, Rosner MR. (1993). Role of threonine residues in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *Journal of biological chemistry* 268:15536-15543.
48. Nakane PK, Pierce GB. (1966). Enzyme labelled antibodies. Preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 14: 929-931.
49. Niveiro M, Aranda I, Peiró G. (2003). Patología de los adenomas hipofisarios. *Revista Española de Patología* 4 (36): 357-372.
50. Niveiro M, Aranda I, Peiró G, Picó A. (2005). Immunohistochemical analysis of tumor angiogenic factors in human pituitary adenomas. *Human Pathology* 36:1090-1095.
51. Onofri C, Theodoropoulou M, Grübler Y, Losa M, Lange M, Stummer W, Stalla GK, Renner U. (2003). Expression and role of VEGF receptors in pituitary adenomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111 DOI: 10.1055/s-2003-817546.
52. Onofri C, Theodoropoulou M, Losa M, Uhl E, Lange M, Arzt E, Stalla GK, Renner U. (2006). Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in normal and adenomatous pituitaries: detection of non-endothelial function of VEGF in pituitary tumors. *Journal of endocrinology* 191: 249-261.
53. Ortiz-Plata A. (1996). Implementación de la técnica de Inmunoperoxidasa para la caracterización de la actividad secretora de los diferentes tipos de células adenohipofisarias. Aplicación en la clasificación de los adenomas hipofisarios. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología) UNAM pp. 8-11.

54. Osamura YR, Tahara S, Kurotani R, Sanno N., Matsuno A, Teramoto A. (2000). Contributions of Immunohistochemistry and *In Situ Hybridization* to the Funcional Analisis of Pituitary Adenomas. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48(4): 445-458.
55. Paek K-II, Kim S-H, Song S-H, Choi S-W, Koh H-S, Youm J-K, Kim Y. (2005). Clinical significance of KI-67 labeling index in pituitary macroadenoma. *J. Korean Med Sci.* 20: 489-494.
56. Palomero JL, Queipo JA, Ruiz JL, Vera CD, Rubio LA, Vera FJ, Jimenez LF. (2004). Estudio de la angiogénesis como factor pronostico de los tumores vesicales p T1G3. *Acta Urológica Española* 28(8): 594-601.
57. Pei L. (2001). Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene. *Journal of Biological Chemistry* 276: 8484–8491.
58. Pierantoni GM, Finelli P, Valtorta E, Giardino D, Rodeschini O, Esposito F, Losa M, Fusco A, Larizza L. (2005). High-mobility group A2 gene expression is frequently induced in non-functioning Pituitary Adenomas (NFPAs) even in the absence of chromosome 12 polysomy. *Endocrine-Related Cancer* 12: 867-674.
59. Pizarro CB, Oliveira MC, Coutinho LB, Ferreira NP. (2004). Measurement of KI-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MIB-1 monoclonal antibody. *Brazilian Journal of Medical and Biological research* 37:235-243.
60. Romero F, Multon MC, Ramos-Morales F, Dominguez AI, Bernal JA, Pintor-Toro JA, Tortoleo M. (2001). Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Research* 29:1300–1307.

61. Ross MH, Kaye GI, Paulina W. (2005). *Sistema Endocrino. Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular* 4º edición Ed. Panamericana Buenos Aires, Argentina., pp 645-655.
62. Sadler TW. (2004). *Sistema Nervioso Longman. Embriología Médica con Orientación Clínica* 9º edición Ed. Medica Panamericana Buenos Aires, Argentina., pp 488-489.
63. Saeger W, Lüdecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe H-J, Petersenn S. (2007). Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *European Journal of Endocrinology* 156:203-216.
64. Shibuya M, Saito F, Miwa T. (1992). Histochemical study of pituitary adenomas with KI-67 and anti-DNA polymerase alpha monoclonal antibodies, bromodeoxyuridine labeling and nucleolar organizer region counts. *Acta Neuropathologica* 84: 178-183.
65. Shiman I, Melmed S. (2005). *Anterior Pituitary Hormones*. Melmed S, Conn PH. eds *Endocrinology Basic and Clinical Principles* 2º edición Ed. Humana Press, Totowa, New Jersey., pp 197-210.
66. Sternberger L. (1979). *Immunocytochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, NY: John Wiley & Sons.
67. Straw LM, McMahan G, App H, Schreck R, Kuchler WR, Longhi MP, Hui TM, Tang C, Levitzki A, Gazit A, Chen I, Keri G, Orfi L, Risau W, Flamme I, Ullrich A, Hirth KP, Shawvwr LK. (1996). Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Research* 56: 3540-3545.

68. Taylor CR, Shi SR, Barr NJ, Wu N. (2006). Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls and standardization. En *Diagnostic Immunohistochemistry*. Dabbs DJ (Ed). Elsevier, Churchill Livingstone USA.
69. Teramoto A, Sanno N, Tahara S, Osamura YR. (2004). Pathological study of Thyrotropin-Secreting pituitary adenoma: plurihormonality and medical Treatment. *Act Neuropathology* 108(2):147-153.
70. Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. (2006). The emerging role of Pituitary Tumor Transforming Gene in tumorigenesis. *Clinical Medicine and Research* 4(12):130-137.
71. Thodou E, Argyrakos T, Kontogeorgos G. (2007). Galectin-3 as a marker distinguishing functioning from silent corticotroph adenomas. *Hormones, international Journal at endocrinology and metabolism*. 6(3): 227-232.
72. Van de Rijn M, Rouse RV. (1994). CD34 review. *Appl immunohistochemical* 2: 71-80.
73. Vidal S, Syro L, Horvath E, Uribe H, Kovacs K. (1999). Ultrastructural and immunoelectron microscopic study of three unusual plurihormonal pituitary adenomas. *Ultrastructural Pathology* 23(3):141-148.
74. Vidal S, Scheithauer BW, Kovacs K. (2000). Vascularity in nontumorous human pituitaries and incidental microadenomas: a morphometric study. *Endocrine Pathology* 11(3): 215-227.
75. Vidal S, Kovacs K, Horvath E, Scheithauer BW, Kuroki T, Lloyd RV. (2001). Microvessel density in pituitary adenomas and carcinomas. *Virchows archive: an international journal of pathology* 438(6): 595-602.

76. Vidal S, Lloyd RV, Moya L, Scheithauer BW, Kovacs K. (2002). Expression and distribution of Vascular Endothelial Growth Factor receptor Flk-1 in the rat pituitary. *The Journal of histochemistry and citochemistry*. 50(4): 533-540.
77. Walter JB (1994). *Glándulas Endocrinas Patología Humana* Ed. El Manual Moderno México DF. pp. 804-808.
78. Yeung C-M, Chan C-B, Leung P-S, Cheng C.H.K. (2006). Cells of the anterior pituitary. *The International Journal Of Biochemistry and cell biology* 38:1441-1449.
79. Zee CS, Go JL, Kim PE. (2003) Imaging of the pituitary and parasellar region. *Neurosurg Clin N Am*.14: 55-80.
80. Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, Melmed S. (1999). Structure, expression and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Molecular Endocrinology* 13:156–166.
81. Zur A, Brandeis M. (2001). Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO Journal* 20:792–801.