



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Instituto Mexicano del Seguro Social**  
**Unidad Médica de Alta Especialidad Siglo XXI**  
**Departamento de Endocrinología**

**Título del Proyecto**

**Distribución los Isotipos 2, 3 y 5 del receptor de Somatostatina en  
Macroadenomas Hipofisarios Clínicamente no Funcionantes en una  
Población Mexicana y su asociación con el comportamiento clínico**

Para obtener el título de  
Maestría en Ciencias Médicas

Presenta  
Claudia Ramírez Rentería

Tutor principal  
Dr. Moisés Mercado Atri

Co-Asesores  
Dr. Baldomero González Virla  
Dra. Guadalupe Vargas Ortega  
Dra. Sonia Gabriela Cheng Oviedo  
Dr. Ernesto Sosa Eroza  
Dr. Blas López Félix  
Dr. Gerardo Guinto Balanzar  
Dra. Lourdes Cabrera



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

**Distribución los Isotipos 2, 3 y 5 del receptor de Somatostatina en  
Macroadenomas Hipofisarios Clínicamente no Funcionantes en una  
Población Mexicana y su asociación con el comportamiento clínico**

**ALUMNO:**

**Dra. Claudia Ramírez Rentería**

Endocrinóloga, Estudiante de Maestría en Ciencias Médicas

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Moisés Mercado Atri**

Endocrinólogo. Jefe de Servicio de Endocrinología.  
Hospital de Especialidades, UMAE "Siglo XXI".  
Instituto Mexicano del Seguro Social.

**ASESORES**

**Dr. Baldomero González Virla**

Endocrinólogo. Maestro en Ciencias Médicas.  
Hospital de Especialidades, UMAE "Siglo XXI".  
Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Dra. Guadalupe Vargas Ortega**

Endocrinóloga. Estudiante de Maestría en Ciencias Médicas.  
Hospital de Especialidades, UMAE "Siglo XXI".  
Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Dra. Sonia Gabriela Cheng Oviedo**

Endocrinóloga, Doctorada En Ciencias. Servicio de Endocrinología, Hospital De  
Especialidades, UMAE "Siglo XXI". Instituto Mexicano del Seguro Social

**Dr. Ernesto Sosa Eroza**

Endocrinólogo, Maestro en Ciencias, Hospital De Especialidades, Centro  
Médico Nacional SXXI. Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Dr. Blas López Félix**

Neurocirujano. Servicio de Neurocirugía. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional "Siglo XXI". Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Dr. Gerardo Guinto Balanzar**

Neurocirujano. Jefe de Servicio de Neurocirugía. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional "Siglo XXI". Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Dra. Lourdes Cabrera**

Patóloga. Jefa del Servicio de Patología Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional "Siglo XXI". Instituto Mexicano del Seguro Social.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres que siempre han sido fuente de inspiración, apoyo, cariño y superación. Su amor incondicional me llevará cada vez más lejos.

A mi familia, especialmente a mis abuelas, que han creído siempre en mí y me han dado las bases para entender que la educación y la perseverancia son las bases del éxito y la superación.

A mis hermanos biológicos y adquiridos que me han acompañado en los altibajos de la vida y que conocen el esfuerzo que implicó esta tesis.

A mis maestros y tutores de quienes he aprendido mucho más que endocrinología.

A todos dedico esta tesis que culmina el esfuerzo de todos durante muchos años, el mérito no es mío sino nuestro.

## ÍNDICE

|           | <b>TITULO</b>   | <b>Pag.</b> |
|-----------|---|-------------|
| <b>1</b>  | <b>Antecedentes</b>   | <b>6</b>    |
|           | Epidemiología y Clínica de los macroadenomas no funcionantes  |             |
|           | Receptores de somatostatina y sus análogos  |             |
|           | Protocolo de tratamiento actual de los adenomas hipofisarios no funcionantes  |             |
|           | Los macroadenomas clínicamente no funcionantes y sus receptores   |             |
|           | Expresión de receptores de somatostatina en macroadenomas clínicamente no funcionantes y respuesta a tratamiento con análogos de somatostatina. |             |
|           | La tecnología del microarreglo y su aplicación en tumores hipofisarios clínicamente no funcionantes.  |             |
| <b>2</b>  | <b>Pregunta de Investigación</b>  | <b>16</b>   |
| <b>3</b>  | <b>Planteamiento del problema</b>   | <b>16</b>   |
| <b>4</b>  | <b>Justificación</b>  | <b>17</b>   |
| <b>5</b>  | <b>Objetivos</b>  | <b>18</b>   |
| <b>6</b>  | <b>Hipótesis</b>  | <b>18</b>   |
| <b>7</b>  | <b>Material y métodos</b>   | <b>18</b>   |
| <b>8</b>  | <b>Diseño del estudio</b>   | <b>18</b>   |
| <b>9</b>  | <b>Universo de trabajo</b>  | <b>18</b>   |
| <b>10</b> | <b>Población blanco</b>   | <b>18</b>   |
| <b>11</b> | <b>Población de estudio</b>   | <b>19</b>   |
| <b>12</b> | <b>Criterios de selección</b>   | <b>19</b>   |
| <b>13</b> | <b>Variables de interés</b>   | <b>19</b>   |
| <b>14</b> | <b>Descripción del estudio</b>  | <b>21</b>   |
| <b>15</b> | <b>Análisis estadístico</b>   | <b>22</b>   |
| <b>16</b> | <b>Factibilidad</b>   | <b>22</b>   |
| <b>17</b> | <b>Aspectos éticos</b>  | <b>23</b>   |
| <b>18</b> | <b>Cronograma de actividades</b>  | <b>23</b>   |
| <b>19</b> | <b>Bibliografía</b>   | <b>24</b>   |
| <b>20</b> | <b>Anexos</b>   | <b>27</b>   |

## **ANTECEDENTES**

### **Epidemiología y clínica de los macroadenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes (MAHNF)**

Los adenomas hipofisarios son neoplasias de origen epitelial que presentan un comportamiento biológico diverso en cuanto a la producción hormonal y actividad proliferativa. Están compuestos por células de la adenohipófisis originados, en su mayoría, en la silla turca, aunque muy raramente pueden llegar a ser ectópicos.

Se detectan hasta en un 20% de la población general cuando se analizan estudios de autopsia o series radiológicas y comprenden aproximadamente el 10% de los tumores intracraneales.<sup>(1,2)</sup>

Los adenomas hipofisarios son poco frecuentes en la juventud, solamente 3.5-8.5% son diagnosticados antes de los 20 años de edad, con una prevalencia mayor en la mujer y con un comportamiento menos agresivo que en el adulto, ya que en los jóvenes suelen ser más pequeños y menos invasivos.<sup>(1)</sup>

Los adenomas de hipófisis son, en general, lesiones pequeñas con una tasa lenta de crecimiento. La sintomatología que originan se encuentra en relación con la alteración de la secreción hormonal y la compresión que ejercen en las estructuras adyacentes.

La mayor parte de los adenomas hipofisarios son clínicamente silentes, ya que algunos de estos tumores no producen hormonas y otros pueden ser productores de gonadotropinas completas o sus subunidades, sin embargo, esta secreción suele ser poco eficiente por lo cual el paciente no presenta un síndrome asociado a la hiperproducción de estas hormonas o fragmentos de ellas<sup>(2)</sup>. Otros más pueden mostrar por estudios inmunohistoquímicos la producción de hormona de crecimiento (GH) o corticotrópica (ACTH) sin el cuadro clínico asociado a esta secreción. En conjunto, estos tumores que no producen un cuadro clínico asociado a hiperproducción hormonal se denominan tumores clínicamente no funcionantes.

La actividad hormonal depende de la célula que da origen al tumor<sup>(1)</sup>, los tumores que no producen ninguna hormona proceden generalmente de las llamadas células nulas y constituyen del 5 al 10% de los adenomas hipofisarios, mientras que los tumores que contienen células productoras de gonadotropinas constituyen aproximadamente 15% de los adenomas hipofisarios y un 90% de los tumores clínicamente no funcionantes<sup>(2)</sup>. Esta producción se puede corroborar con estudios de inmunohistoquímica, detección del RNA mensajero de los productos de los genes involucrados o por los niveles hormonales circulantes de las hormonas<sup>(2)</sup>.

Estos tumores silentes o clínicamente no funcionantes son detectados por estudios de imagen de manera incidental o en pacientes que presentan sintomatología compresiva asociada a su expansión, como cefalea o disminución del campo visual por compresión del quiasma óptico.

Un adenoma hipofisario, que origina sintomatología compresiva suele ser mayor de 1 cm de diámetro por lo que son llamados también macroadenomas (MAH).

Estos tumores pueden ocasionar hipopituitarismo al comprimir al resto de las células hipofisarias productoras de hormonas. También originan alteraciones visuales, invasión local a senos paranasales, senos cavernosos y parénquima cerebral.

Aunque pueden llegar a ser localmente invasores y agresivos, en su mayoría no presentan una transformación cancerosa. Esto se debe, probablemente, a que no expresan algunos oncogenes asociados a otros tumores neuroendócrinos, como p53 o ras<sup>(2)</sup>. Debido a esta naturaleza benigna, las células tumorales pueden conservar, en cierto grado, las características generales de sus contrapartes normales, como son receptores hormonales y la retroalimentación o respuesta a agonistas o antagonistas hormonales<sup>(2)</sup>.

Existen varios genes involucrados en la producción de los adenomas hipofisarios. Algunos genes se encuentran normalmente expresados durante el desarrollo habitual de la hipófisis y sus alteraciones se han relacionado con la presencia de tumores como el PTTG<sup>(4)</sup>. También se ha estudiado la asociación con genes involucrados en la diferenciación de las células hipofisarias así como su respuesta hormonal, como es el caso de los genes Pit-1, Prop1, CREB, el gen del receptor de estrógenos (ER) y algunos factores de transcripción y de crecimiento<sup>(2)</sup> así como oncogenes como c-myc<sup>(5)</sup>. El diagnóstico de un macroadenoma hipofisario no funcionante (MAHNF) se obtiene una vez que se ha descartado hiperproducción hormonal y se cuenta con una imagen radiológica.

Aunque se trata de un tejido tumoral, los adenomas de hipófisis conservan características de tejidos normales, entre ellos, la expresión de receptores como la somatostatina, hormona de crecimiento y hormona liberadora de TSH. Y también conservan la capacidad de responder a los estímulos normales de retroalimentación inducidos por estos receptores, aunque en ocasiones se requiere que estos estímulos se presenten con mayor afinidad o en mayor cantidad para ser efectivos.

### Los receptores de somatostatina en tumores humanos

Los receptores de somatostatina se expresan de manera normal en muchos tejidos para regular su funcionamiento. También se expresan en tumores benignos y malignos ya sean de estirpe neuroendócrina o no. Los estudios más extensos se han realizado en pacientes con tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos (carcinoide, insulinoma, gastrinoma, etc), aunque su presencia se ha reportado en varios tejidos distintos. Se ha intentado asociar su presencia con las características clínicas de los tumores. En la siguiente tabla se resumen algunos de los estudios realizados previamente y las asociaciones encontradas.

| Autores                               | n  | Año  | Tipo de tumores   | Resultados   |
|---------------------------------------|----|------|---|--|
| Ioannou M, et al.                     | 29 | 2008 | Osteosarcomas   | Los tumores positivos tuvieron menor supervivencia (50% vs 76% a los 4 años)   |
| Reubi JC y Kvols L.                   | 39 | 1992 | Carcinomas de células renales   | 72% son positivos y tienen menor supervivencia.  |
| Reubi JC, Schaer JC, Wasser B, et al. | 55 | 1994 | Acromegalia, meningioma, neuroblastoma, carcinoide, mama, linfoma. Medular de tiroides, células pequeñas, de islotes, ovario. | Todos presentan por lo menos 1 tipo de receptor. 46% tuvieron afinidad con octreótide. No se conocían los 5 isotipos del receptor. |
| Reubi JC, Kappeler BW,                | 24 | 1998 | Carcinoide, acromegalia, mama, meningioma, meduloblastoma,  | Detección solamente sstr2A por IHQ, autoradiografía y mRNA. Sin  |

|                                    |    |      |   |   |
|------------------------------------|----|------|---|---|
| Laissue J, et al.                  |    |      | paraganglioma, linfoma, leiomiomasarcoma, adenocarcinoma de colon y esófago   | concordancia entre los métodos.   |
| Fischer T, Doll C, Jacobs S et al. |    | 2008 | Acromegalia, carcinoide, insulinoma, feocromocitoma, mama, ovario, CaCU, colorectal, adenocarcinoma pancreático, gástrico, próstata, glioblastoma, astrocitoma, meningioma. | Anticuerpo monoclonal vs sstr2A no disponible comercialmente. Positivos en todos los tejidos, diferente en hipófisis normal vs adenoma.                 |
| Oberg K., Kvols L, Caplin M        | R  | 2004 | Carcinoide, gastrinoma, VIPoma, insulinoma, glucagonoma, tumores no funcionantes gastrointestinales   | Todos tienen todos los isotipos de receptores en distintas proporciones. Sensibles a octreótide para diagnóstico y tratamiento.                         |
| Waisberg J, et al.                 | 1  | 2006 | Gastrinoma maligno  | Expresión difusa en las células   |
| Janson ET, et al.                  | 25 | 1996 | Carcinoides   | 20% de los tumores con rastreos positivos no responden a octreótide. El mRNA del sstr correlaciona mejor a la respuesta, poco accesible en laboratorios |

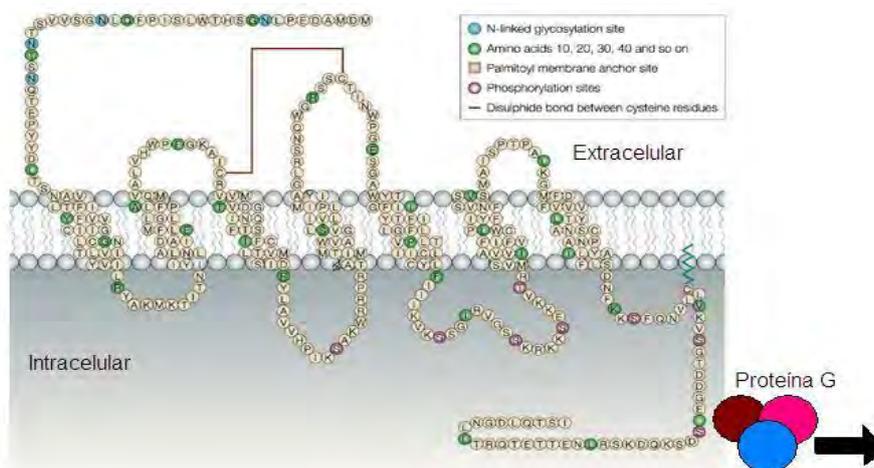
R= revisión

A pesar de la abundancia de estudios sobre los receptores de somatostatina, se aprecia que los resultados difieren entre tipos de tumores. En los tumores neuroendócrinos su presencia se asocia a un buen pronóstico y a respuesta al tratamiento con octreótide, mientras que en otros tumores malignos, la positividad del receptor es de mal pronóstico. Los estudios hechos con hipófisis humana no reportan macroadenomas clínicamente no funcionantes y no hay un valor claro de asociación de estos receptores con el pronóstico.

### Receptores de somatostatina y sus análogos

La somatostatina es una hormona reguladora, producida por células neuroendócrinas, inflamatorias e inmunitarias. Se le considera la hormona inhibidora por excelencia, ya que la mayoría de sus funciones antagonizan a la del resto de las hormonas, principalmente, inhibiendo su secreción o función.

Sus acciones están mediadas a través de un receptor que pertenece al grupo de receptores de siete dominios transmembrana, asociado a proteína G. La proteína G inicia una cascada de señales intracelulares mediadas por el cAMP que producen finalmente el efecto regulador de la hormona sobre la célula<sup>23</sup>.



La somatostatina tiene 5 subtipos conocidos de receptores (sstr) llamados sstr1 a 5. Todos proceden de la misma familia de genes, pero el procesamiento del RNA mensajero (mRNA) es distinto para cada uno dependiendo de la célula de la que se trate, la situación metabólica o funcional de la misma y los requerimientos del organismo.

Dependiendo de la cantidad y tipo de isoformas de receptores que se expresen, se dará una respuesta específica de la célula frente a la hormona.

Cada una de estas isoformas, a pesar de ser del mismo tipo de receptor, está relacionada a una vía de señalización intracelular diferente. Algunas de estas vías se asocian al control de la secreción hormonal que son las más conocidas. Otras vías están relacionadas con la detención del crecimiento celular a través de mecanismos citostáticos y citotóxicos. Estas vías han sido estudiadas hasta fechas más recientes.

El estudio de estos receptores ha adquirido importancia en diversas áreas del conocimiento en años recientes. Los receptores de somatostatina se consideran potenciales marcadores tumorales nuevos con implicaciones diagnósticas y terapéuticas.<sup>24</sup> Las alteraciones cualitativas o cuantitativas de un receptor de membrana como el de somatostatina puede influir en la homeostasis del órgano, indicar presencia de enfermedad o aun representar la base bioquímica de la misma. Los resultados actuales indican que el receptor de somatostatina tiene una localización preferente membranal incluso en los tejidos tumorales neuroendócrinos.<sup>25</sup> Estudios recientes han empleado anticuerpos mucho más específicos en el estudio de los tumores neuroendócrinos con resultados superiores en cuanto a la definición de imagen, la localización intracelular de los receptores en cada uno de estos tumores y su asociación con el comportamiento clínico, por lo que se espera que en los siguientes años, los resultados de las investigaciones en curso representen un avance diagnóstico y probablemente terapéutico para los pacientes con tumores neuroendócrinos. En este momento, sin embargo, el estándar de oro para el estudio inmunohistoquímico de estos receptores es el anticuerpo policlonal de conejo contra sst<sub>2A</sub> (isotipo encontrado únicamente en humanos).<sup>26</sup>

Los estudios inmunohistoquímicos de estos receptores, especialmente el del isotipo sst<sub>2A</sub> pueden tener implicaciones en predecir estudios de diagnóstico como los estudios de medicina nuclear y la respuesta a octreótide.<sup>26,27,28</sup>

Por las características de estos receptores se ha propuesto el uso de análogos de esta hormona en el tratamiento de diversos tipos de tumores, principalmente de los tumores de origen neuroendócrino, entre los cuales se encuentran los adenomas de hipófisis.

Los efectos sobre el crecimiento tumoral, así como la secreción de hormonas están mediados principalmente por las isoformas del receptor de somatostatina 2, 3 y 5.<sup>23</sup>

En la actualidad existen múltiples análogos de la somatostatina, muchos de los cuales se encuentran aun en etapa experimental. El más conocido de ellos es el octreótide subcutáneo, que es un octapéptido con capacidad de unirse a las isoformas 2 y 5 del receptor de la somatostatina con una afinidad hasta mil veces mayor y una vida media más prolongada que la de la somatostatina endógena. Fue lanzado al mercado en 1988 y múltiples estudios

han mostrado eficacia en el control de varias patologías neuroendócrinas como el insulinoma, carcinoide, etc<sup>29</sup>.

Actualmente los análogos de somatostatina se utilizan con éxito en el tratamiento de los tumores hipofisarios secretores de hormona de crecimiento y el control de síntomas gastrointestinales ocasionados por tumores neuroendócrinos.<sup>30</sup> También se encuentran en desarrollo otros análogos de la somatostatina, llamados análogos universales, que tienen afinidad por todos las isoformas de los receptores de somatostatina y se considera que podrían tener un uso dentro de los tumores hipofisarios, incluyendo los no funcionantes.

Así mismo, se está experimentando con compuestos quiméricos que afectan la actividad de los receptores de somatostatina y dopamina en los tumores neuroendócrinos.

Todos estos estudios han tenido resultados buenos en cierto tipo d tumores, sin embargo, los estudios realizados con MAHNF son controversiales por lo que se han propuesto diferentes métodos para determinar que tumores tendrán mejores respuestas a estos análogos.

### **Protocolo de tratamiento actual de los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes**

Debido a que estos tumores son hormonalmente silentes, la mayoría de los pacientes acuden a valoración solo cuando presentan datos compresivos asociados al crecimiento tumoral, como cefalea o alteraciones visuales y síntomas asociados a déficits hormonales secundarios a la compresión de la hipófisis normal por el tumor <sup>5</sup>. En estos casos, generalmente el adenoma es mayor de 1 cm, es decir es un MAHNF. En muchos casos los MAHNF, al momento del diagnóstico tienen alrededor de 2 cm en su diámetro mayor. En algunos otros casos el tumor se detecta de manera incidental en estudios radiológicos solicitados por otras patologías.

#### ***Tratamiento quirúrgico***

El tratamiento de primera línea indicado en todos los pacientes con MAHNF es la resección quirúrgica, además de que es el único tratamiento considerado como curativo <sup>(5,6)</sup>.

Los MAHNF suelen ser grandes al momento del diagnóstico, o se encuentran invadiendo estructuras adyacentes, muchas veces no pueden ser resecados por completo y por lo tanto presentan riesgo para recurrencias. Estas recurrencias pueden detectarse dentro del primer año después de la cirugía e incluso hasta 10 años después.

En los pacientes en los que el tumor se reseca por completo, hay recurrencia en menos del 3% de los casos. Cuando el tumor fue resecado por completo, frecuentemente por complicaciones técnicas quirúrgicas o invasión a estructuras vecinas como el seno cavernoso, hasta un 32% de los pacientes habrá recrecimiento del tumor a 5 años y un 44% a 10 años <sup>(3)</sup>.

#### ***Tratamientos coadyuvantes***

El tratamiento de los tumores recidivantes no está bien establecido aún. Se utilizan hasta la fecha: la reintervención quirúrgica y el uso de un tratamiento coadyuvante como la radioterapia o el tratamiento médico.

La radioterapia se emplea en los pacientes que tienen un tumor residual grande y por lo tanto tienen un riesgo importante de recurrencia con posibilidad de afectación visual o invasión a senos cavernosos. Los estudios han reportado una disminución del riesgo de recurrencia <sup>(3,5)</sup>, aplicado de manera postoperatoria en MAHNF. Estos pacientes se encuentran libres de recurrencia desde un 72% a los 10 años <sup>(8)</sup> hasta 96% <sup>(10)</sup>. Sin embargo, el uso de la radioterapia aun no está establecido como obligatorio en estos pacientes ya que también presenta múltiples efectos adversos y desventajas.

Las principales desventajas que tiene la radioterapia son: que no es accesible a muchos de los pacientes, se asocia con una deficiencia hormonal posterior mucho mayor que el de la cirugía convencional <sup>7,8</sup>(hasta 66%), el hecho de que no puede utilizarse con seguridad cuando el tumor se encuentra muy cercano al quiasma óptico por el riesgo de lesionarlo <sup>(8)</sup>, la necesidad de esperar meses e incluso años para obtener la respuesta esperada, así como el riesgo potencial de carcinogénesis asociada a la radiación, reportada en 1 a 2% de los casos. Por estas razones, no son candidatos a radioterapia los pacientes con tumores pequeños, con bajo riesgo de progresión por la probabilidad de que la cirugía convencional haya sido exitosa, aunque la administración del tratamiento en general queda a criterio del grupo de médicos que valoran cada caso.

Tampoco es clara aun la definición de riesgo alto de recurrencia en estos tumores. Algunos datos que podrían predecir el riesgo de recurrencia:

- Tamaño del tumor: entre mas grande es el tumor, es menor la probabilidad de una resección completa, lo que aumenta el riesgo de recurrencia.<sup>(16)</sup> No hay un tamaño definido para definir un tumor en riesgo, sin embargo se considera que en general tumores mayores de 3 cm tienen más riesgo porque la mayoría están invadiendo alguna estructura adyacente al momento del diagnóstico.
- Tumores invasores: tumores que rodean la carótida por completo, invasión al seno cavernoso, los tumores que invaden tejidos paraselares como la duramadre, el hueso, senos paranasales, espacio subaracnoideo y leptomeninges <sup>(8,16)</sup>.
- Marcadores de proliferación celular elevados: la atipia celular así como una alta frecuencia de mitosis <sup>(16)</sup>, la detección por inmunohistoquímica de moléculas como PCNA, Ki-67 o MIB-1 se asocia a tumores más agresivos<sup>(8)</sup>, otros marcadores como p53, p27, E-cadherina, metaloproteinasa de matriz 9 y el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos se encuentran en estudio <sup>(9)</sup> al igual que la determinación de niveles de gonadotropinas y sus subunidades antes y después del tratamiento quirúrgico <sup>(12)</sup>.

Estos marcadores no se solicitan en el seguimiento habitual de los pacientes postoperados por MAHNF. Hasta el momento solamente se han realizado estas determinaciones con propósitos de investigación y por lo tanto no se cuenta con puntos de corte específicos para determinar que pacientes tienen mayor riesgo de recurrencia.

## Los macroadenomas clínicamente no funcionantes y sus receptores

Debido a su naturaleza benigna, los MAHNF conservan algunas de las características de las células normales de la hipófisis, entre ellas la expresión de múltiples receptores hormonales, aunque esta expresión puede ser en una frecuencia o densidad diferente a las de las células normales y por lo tanto la respuesta a hormonas por retroalimentación puede estar alterada en estos tumores.

Los MAHNF frecuentemente muestran receptores de dopamina <sup>(13)</sup>, sin embargo, la respuesta a tratamiento médico es baja. Menos del 20% a 30% muestran reducción del tamaño tumoral con bromocriptina o agonistas dopaminérgicos de larga duración <sup>(3,11)</sup>.

Se ha intentado incluso, la reducción del tamaño tumoral con tratamiento basado en octreótide, lo que ha sido desalentador ya que ocurre solamente en 11 a 13% de los casos y su costo es elevado, por lo cual aun no se emplea con regularidad en estos pacientes <sup>(3)</sup>. Sin embargo, la desventaja de estos reportes es que se han hecho con estudios basados en pocos tumores, estudios in vitro, otros clínicos pero con octreótide de acción corta subcutánea varias veces al día, lo cual afecta la adherencia al tratamiento, así como el uso de criterios de respuesta diferente (algunos requieren disminución del tamaño tumoral, mientras que otros se centran en la detención del crecimiento).

Los estudios que han utilizado el octreótide como tratamiento en MAHNF no son uniformes tampoco en cuanto a tiempo de uso necesario para valorar una respuesta. Algunos estudios se han realizado con dosis tan pequeñas como 100 µg por día por vía subcutánea diaria por dos meses, con respuestas de alrededor del 10% en cuanto a reducción del tamaño tumoral <sup>(18)</sup>. Tjerk, et. al. utilizaron octreótide subcutáneo a dosis de 1200 µg por día por vía subcutánea y reportan respuestas poco aparentes en el tamaño tumoral pero con disminución en el nivel de secreción de subunidad  $\alpha$ , utilizándola por 6 meses, la cual también fue considerada una variable de respuesta <sup>(17)</sup>. Liuzzi, et. al. reportan una reducción tumoral del 15% en 20 pacientes <sup>(19)</sup>, Plockinger et al reportaron una reducción de 50% en cuatro pacientes <sup>(20)</sup>.

La poca respuesta al tratamiento con octreótide puede deberse a:

1. Corta duración de la terapia (menos de 6 meses).
2. Baja densidad de receptores de dopamina y somatostatina.
3. Defectos post-receptor en el tumor

Se sugiere que la combinación de octreótide con cabergolina puede tener un efecto de sinergia por sus efectos celulares distintos <sup>(21)</sup>. Andersen, et. al. utilizaron la combinación de octreótide 200 µg por día por vía subcutánea y cabergolina 0.5 mg diarios vía oral. Este estudio reportó una reducción del tamaño tumoral en un 30% durante los 6 meses en los que se aplicó el estudio <sup>(11)</sup>. Con respecto a este tema, algunos estudios sugieren que la cabergolina tiene mayor efecto en la reducción del tumor que la bromocriptina <sup>(22)</sup>. La desventaja de la combinación es que el costo se eleva de manera importante tanto por el uso de dos medicamentos como por las dosis altas a las que se han manejado y la respuesta que se ha obtenido hasta el momento no justifica el incremento en el gasto.

Debido a los resultados en estos estudios, se ha considerado la importancia de verificar la presencia de los receptores de somatostatina antes de iniciar un tratamiento con un análogo.

Los estudios iniciales a este respecto se hicieron con marcadores radioactivos que permitieran captar una imagen por medio de un gammagrama, en los que en teoría se podría establecer una correlación entre la captación y la respuesta al tratamiento. Este tipo de métodos de imagenología funcional se emplea con éxito en otro tipo de tumores neuroendócrinos, sin embargo, no se encontró la correlación esperada en los tumores hipofisarios. Actualmente se ha iniciado una nueva etapa en el estudio de MAHNF a nivel molecular, lo cual ha explicado en parte esta discordancia por la expresión diferencial de los receptores de somatostatina.

### **Expresión de receptores de somatostatina en macroadenomas clínicamente no funcionantes y respuesta a tratamiento con análogos de somatostatina.**

Los tipos 2 y 5 (sst<sub>2</sub> y sst<sub>5</sub>) son los que determinan el principal efecto inhibitorio del efecto de la somatostatina a nivel secretorio y de crecimiento, por lo que usar el octreótide tendría un uso lógico en estos tumores, pero ante la respuesta parcial observada en algunos estudios se ha propuesto estudiar con mayor amplitud estos tumores antes de proponer un tratamiento coadyuvante.

Con la intención de seleccionar mejor a los pacientes que pueden responder a estos tratamientos nuevos se han intentado varias maneras de determinar la presencia de receptores en los MAHNF.

Se han realizado varios estudios que utilizan el octreótide marcado radioactivamente durante un proceso de rastreo para determinar la presencia de estos receptores y cuantificar la captación por el tumor, algunos estudios correlacionan la captación con la respuesta que tendrá el tumor al tratamiento con el análogo de somatostatina<sup>(14,15)</sup>. Sin embargo, debido a que la somatostatina tiene afinidad por otros isotipos de receptores de somatostatina, aun cuando lo hace con menor especificidad, otros estudios han mostrado que la sola captación del octreótide no siempre se encuentra en relación con la respuesta al tratamiento, por lo que se ha intentado con otros métodos discriminar cuales de los receptores se expresan en la superficie del tumor y en que cantidad.

También se han hecho intentos por predecir la respuesta que tendrán los tumores al tratamiento con octreótide combinando estudios funcionales y de imagen. Duet, et al.<sup>(14)</sup> proponen el uso del Índice de densidad (DI) en el que se combina la captación de octreótide con el tamaño del tumor por resonancia magnética. Encontraron que este índice es menor en los MAHNF comparado con los adenomas productores de hormonas y que esto correlaciona con la respuesta al octreótide medida en porcentaje de reducción de tamaño tumoral. Sin embargo, este índice aun no se encuentra estandarizado y el uso del rastreo con octreótide no es habitual en nuestro medio.

La detección por inmunohistoquímica de los receptores sst ha adquirido importancia recientemente, ya que su densidad en la membrana citoplasmática podría estar en relación directa con la efectividad del tratamiento con análogos de somatostatina, la técnica permite una valoración morfológica del perfil de receptores sst y permitiría predecir la respuesta al tratamiento y validar la efectividad del tratamiento <sup>(16)</sup>. Los estudios principales al respecto de estos receptores, son en tumores productores de hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL).

Se han hecho algunos estudios inmunohistoquímicos que mostraron que aproximadamente un 50% de los tumores hipofisarios clínicamente no funcionantes los presentan <sup>(11)</sup>. Van der Hoek, et al reportan que la expresión de RNA mensajero de los distintos receptores de somatostatina en MAHNF es aproximadamente: sst<sub>1</sub> en 38%, sst<sub>2</sub> en 75%, sst<sub>3</sub> en 43%, sst<sub>4</sub> en 13% y sst<sub>5</sub> en 48%<sup>33</sup>. Los estudios con RNA mensajero pueden dar un reporte no solamente de presencia sino de la integridad del receptor, sin embargo, es técnicamente más difícil obtener resultados a este respecto y no se encuentran disponibles de manera general en nuestro medio.

Otra de las desventajas del estudio de Van der Hoek es que la población estudiada fue de un riesgo más bajo que nuestra población y el tamaño de la muestra no es suficiente como para asegurar que los resultados obtenidos puedan generalizarse.

Aun se desconoce si el caracterizar los receptores sst en los MAHNF tendrá utilidad clínica, para determinar, por ejemplo, que pacientes serán candidatos para el uso de estos análogos después del tratamiento quirúrgico inicial y cuales deberán ser enviados a radioterapia después del tratamiento inicial con cirugía.

Por el momento se intenta describir la distribución de estos receptores en distintas poblaciones para que en un futuro se pueda investigar la asociación de estos receptores con la respuesta al tratamiento con una selección más específica de los pacientes que serán candidatos a un tratamiento

### **La tecnología del microarreglo y su aplicación en tumores hipofisarios Clínicamente no funcionantes.**

La tecnología del microarreglo de tejidos (TMA) es una herramienta de investigación de alta productividad que ha facilitado y acelerado el estudio de los tejidos *in situ*<sup>34</sup>. En este proceso se toman muestras pequeñas de varios tumores que previamente han sido fijados en parafina y se incluyen en un sitio previamente determinado de un nuevo bloque de parafina. Cada tumor tiene un sitio en el bloque y se pueden crear mapas con la localización exacta de cada

Un microarreglo de tejido sirve para corroborar los resultados de otros microarreglos, como los microarreglos de DNA en los que se analizan cientos de genes en un chip, se hacen análisis de perfiles de expresión de proteínas en tumores y tejidos normales se analizan las vías que se encuentran alteradas en cada uno de estos tejidos. Al analizar varios tejidos, incluso cientos de ellos, de

una sola vez, el estudio realizado con un microarreglo adquiere poder estadístico.

Para construir un microarreglo se requieren los datos clínicos relevantes, el tejido que generalmente se encuentra fijado en parafina y una tinción de hematoxilina y eosina que deben ser valoradas por el patólogo para seleccionar la región más representativa del tejido que debe ser incluida. Una vez determinadas las áreas que se van a incluir, se cortan del bloque donador con el microarreglador que tiene un estilete especial de un diámetro específico a criterio del investigador, que extrae un cilindro de tejido. El mismo microarreglador corta en un segundo bloque de parafina vacío que debe tener idealmente una superficie de 45x20 mm y un área práctica para el microarreglo de 20x18 mm como mínimo<sup>34</sup>. Con estas dimensiones y un estilete de 1 mm como que se empleará en este protocolo se pueden tener alrededor de 200 muestras en un solo microarreglo. Con un estilete de 0.6 mm y una distancia de 1 mm entre muestras, se puede tener hasta 500 muestras en un microarreglo.

Los microarreglos que se construyen con parafinas se hacen a una temperatura ambiente no mayor de 37°C y la perforación de la parafina recipiente se debe hacer en cuanto se extrae la muestra del tejido. No se pueden hacer por adelantado ya que la parafina se modifica con la temperatura.

Para identificar adecuadamente los tejidos dentro del microarreglo, los tumores se numeran secuencialmente y se colocan en una posición específica determinada por la fila y la columna. El orden es elegido por el investigador. Se considera importante hacer varias "secciones" o subarreglos dentro de la parafina, estos subarreglos contendrán un grupo específico de tejidos que son similares por alguna característica o son bloques distintos del mismo tumor (copias) del microarreglo de manera que se pueda corroborar que la tinción fue uniforme. (Ver figura 2)

Debido a que la inmunohistoquímica por si misma puede ser analizada de manera muy subjetiva y a criterio del patólogo, se han diseñado programas de computación y analizadores especiales que disminuyen esta subjetividad y permiten una valoración más objetiva de la positividad o negatividad de una tinción con significancia estadística, sin embargo, todos estos procesos requieren equipo especial, entrenamiento y personal capacitado en todos los niveles del procesamiento de los tejidos y la información obtenida de ellos, por lo que aun no es una tecnología empleada universalmente<sup>35</sup>.

Los microarreglos de tejido se han empleado con éxito en el análisis a gran escala de los tumores, como en el cáncer de mama o neoplasias hematológicas. Debido a que la tecnología actual detecta genes a una velocidad muy alta, el siguiente estudio, estudios sobre el tejido, también deben optimizarse con los microarreglos de tejido. En un futuro se espera que los análisis procedentes de los microarreglos permitan hacer inferencias diagnósticas y pronósticas en los pacientes a nivel clínico. Por ejemplo, se podría correr un microarreglo en el tumor resecado de un paciente y compararlo con los análisis estadísticos previos y predecir si el que exprese una u otra proteína, que la exprese en la membrana o en el núcleo o en una cantidad determinada se asocia más con un tumor agresivo y seleccionar a los

pacientes que serán candidatos para una terapia u otra<sup>35</sup>. Estas elecciones se realizan hasta el momento por medio de criterios clínicos y escalas pronósticas basadas en las características del paciente, pero agregar la característica molecular del tumor a estas escalas daría una mayor precisión al manejo de los pacientes.

Actualmente se encuentran en proceso microarreglos de tejidos para muchas de las neoplasias, sin embargo, se pueden crear microarreglos para estudiar cualquier proteína en cualquier tejido, por lo que las aplicaciones de los microarreglos van más allá de la oncología<sup>36</sup>.

En cuanto a la hipófisis, los microarreglos se han centrado en el estudio de los tumores productores de GH y prolactina, de manera que se intenta detectar alteraciones en la expresión de sus proteínas, entre ellas los receptores de somatostatina, que se encuentran expresadas en la membrana, con un mayor predominio del sstr2 y sstr5<sup>37</sup>. Otros microarreglos en hipófisis se han enfocado en la producción hormonal<sup>38</sup>. Hasta el momento no se han realizado microarreglos en tumores hipofisarios no funcionantes respecto a la expresión de los receptores de somatostatina.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué proporción de pacientes postoperados con diagnóstico de MAHNF en el hospital de Especialidades UMAE Siglo XXI del IMSS tienen una inmunohistoquímica positiva para las isoformas sstr 2, 3 y 5 del receptor de somatostatina?

¿Los pacientes con inmunohistoquímica positiva para las isoformas sstr 2, 3 y 5 del receptor de somatostatina tendrán diferencia en cuanto al tamaño tumoral e invasividad del tumor respecto a los pacientes con inmunohistoquímica negativa?

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los macroadenomas de hipófisis no funcionantes son tumores intracraneales que a pesar de su etiología benigna se asocian a morbilidad importante como alteraciones visuales y déficits hormonales. El tratamiento inicial y el único curativo es la resección quirúrgica completa del tumor, sin embargo, esto no es posible en la mayoría de los casos.

Actualmente no existe un algoritmo para indicar un tratamiento coadyuvante adecuado en los pacientes en los que hay un remanente tumoral postquirúrgico con potencial de recurrencia. La decisión de indicar un tratamiento o cual emplear, se realiza con base en el criterio clínico de los médicos tratantes y de la disponibilidad del tratamiento. Todos estos tratamientos representan un gasto importante y efectos secundarios relevantes. De la misma manera el pronóstico de los tumores se hace con base a datos clínicos únicamente.

Esta situación ha llevado a la necesidad de investigar nuevos marcadores tumorales que predigan el comportamiento clínico de los tumores y nuevos tratamientos que ayuden a disminuir el recurrencia tumoral, aun en los casos en los que no se puede acceder a tratamiento con radioterapia. El octreótide, análogo de la somatostatina ha sido utilizado para estos fines en

tumores similares, como es el caso de la acromegalia, con buenos resultados. Sin embargo el empleo de este tratamiento en algunos estudios ha tenido resultados controversiales. Hasta el momento no es posible predecir que pacientes tendrán una respuesta favorable al tratamiento coadyuvante con el octreótide por lo que se ha propuesto seleccionarlos con base en la presencia de los receptores de somatostatina.

Se requieren de estudios con un número más amplio de tumores para tener un panorama más aproximado de la presencia de estos receptores en los MAHNF, asociarlas a su comportamiento clínico y en un futuro ayudar a la selección de los pacientes adecuados para el tratamiento con análogos de somatostatina y decidir si nuestra población se comporta de la misma manera que las otras.

## **JUSTIFICACIÓN**

En el servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, se atiende a más de 300 pacientes en seguimiento pos-operatorio por MAHNF y mensualmente se agregan 2 a 3 pacientes con esta patología que recibirán tratamiento por primera vez. En este servicio se les brinda una atención neuroendocrinológica, neurooftalmológica y neuroquirúrgica integral.

Los pacientes que acuden a nuestro servicio tienen tumores de aproximadamente 2 cm al momento del diagnóstico, con invasión a estructuras vecinas. Aproximadamente un 80% de estos pacientes tienen un remanente tumoral después de la cirugía, por lo que se considera una población de alto riesgo. Las recurrencias se presentan en aproximadamente un 45% y se pueden complicar con síndrome quismático o síndrome de cráneo hipertensivo. Estos pacientes requieren frecuentemente reintervenciones transcraneales, lo que conlleva una alta tasa de morbi-mortalidad.

Actualmente no existe un marcador claro de cuales pacientes evolucionarán de manera más agresiva y se deben considerar para recibir una terapia coadyuvante después de la primera cirugía o que tipo de terapia deben recibir (radioterapia o tratamiento médico).

Determinar por medios inmunohistoquímicos que pacientes podrían tener receptores de somatostatina y por lo tanto podrían tener una buena respuesta al tratamiento médico es importante, ya que en ellos, se podría administrar el análogo de la somatostatina inmediatamente después de ser intervenidos y evitar un recrecimiento tumoral, sin arriesgarlos a los efectos adversos de otras terapias coadyuvantes una vez que se ha presentado la recurrencia del tumor.

Planteamos un estudio inmunohistoquímico por medio de la creación de un microarreglo de tejido de los MAHNF (obtenidos al momento de la desmasificación quirúrgica), para identificar la distribución de receptores sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> y sst<sub>5</sub> que en un futuro nos permita relacionar la presencia de estos receptores con una menor recurrencia después del tratamiento con análogos de somatostatina, así como iniciar el estudio molecular a gran escala de estos tumores.

## OBJETIVOS

### Generales

- Describir en nuestra población la frecuencia de MAHNF con inmunohistoquímica positiva para las isoformas sstr 2, 3 y 5 del receptor de somatostatina y su localización subcelular en un microarreglo de tejido.
- Asociar la presencia de los isotipos sstr 2, 3 y 5 con la invasividad o el tamaño tumoral inicial.

### Específicos

- Crear un microarreglo de tejido con los tumores obtenidos en nuestra unidad.
- Reportar la presencia por inmunohistoquímica (IHQ) de receptores sstr<sub>2</sub>, sstr<sub>3</sub> y sstr<sub>5</sub> en los MAHNF que se encuentren disponibles de los últimos tres años y los pacientes que se operen durante el tiempo del estudio.
- Describir la localización de los receptores sstr<sub>2</sub>, sstr<sub>3</sub> y sstr<sub>5</sub> dentro de la célula tumoral.
- Relacionar la presencia de estos receptores con el tamaño tumoral al momento del diagnóstico.
- Relacionar la presencia de estos receptores con la invasividad al momento del diagnóstico.

## HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

De los tumores obtenidos de pacientes postoperados con diagnóstico de MAHNF en el hospital de Especialidades UMAE Siglo XXI del IMSS un máximo del 75 % tendrán una inmunohistoquímica positiva para la isoforma sstr 2 y un máximo de 48% tendrá inmunohistoquímica positiva para la isoforma sstr 5.

Los tumores que tengan inmunohistoquímica positiva para alguno de los receptores sstr tendrán mayor frecuencia de invasividad.

Los tumores que tengan inmunohistoquímica positiva para alguno de los receptores sstr tendrán mayor tamaño tumoral al momento del diagnóstico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Diseño del estudio:** Transversal, comparativo.

**Universo de trabajo.** Servicio de Endocrinología, Servicio de Neurocirugía y Servicio de Patología, Hospital de Especialidades, UMAE Siglo XXI, IMSS.

**Población blanco.** Pacientes con diagnóstico de tumor hipofisario clasificado como MAHNF.

**Población de estudio.** Pacientes tratados en el servicio de Endocrinología, HE CMN "Siglo XXI", con diagnóstico de MAHNF que se sometieron a tratamiento neuroquirúrgico.

### **Criterios de selección.**

- Criterios de inclusión:
  - Pacientes con diagnóstico de MAHNF a quienes se les realizó tratamiento neuroquirúrgico en nuestra unidad en el periodo de estudio o tres años previos (año 2005)
  - Que cuenten con carta de consentimiento informado firmada.
  - Que se cuente con las parafinas del tumor.
- Criterios de no inclusión:
  - Pacientes en los que no se puedan recabar los datos completos en el expediente (Anexo 2).
  - Pacientes en los que no se haya podido recuperar tejido tumoral durante la cirugía.
  - Pacientes cuyo tejido obtenido no sea adecuado o suficiente para inmunohistoquímica por problemas técnicos, determinado por la valoración del patólogo de las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina.
- Criterios de exclusión
  - Pacientes que retiren el consentimiento.

### **VARIABLES DE INTERÉS**

- Sexo
  - Tipo de variable: Cualitativa.
  - Escala de medición: nominal dicotómica
  - Unidad de medición: hombre / mujer
  - Definición conceptual y operacional: sexo de asignación del sujeto
- Edad
  - Tipo de variable: Cuantitativa.
  - Escala de medición: continua.
  - Unidad de medición: años
  - Definición conceptual y operacional: edad en años cumplidos desde la fecha de nacimiento
- Tiempo de evolución de la enfermedad
  - Tipo de variable: Cuantitativa.
  - Escala de medición: continua.
  - Unidad de medición: años.
  - Definición conceptual y operacional: Tiempo en años desde los primeros datos clínicos atribuibles al MAHNF.
- Presencia de isoforma de receptores de somatostatina 2:

- Variable cualitativa
  - Escala de medición: nominal
  - Unidad de medición: si/no
  - Definición: positividad por inmunohistoquímica en las células tumorales.
  - Definición operacional: positividad por inmunohistoquímica en membrana según algoritmo diseñado para este propósito en software de microarreglos de isoforma de receptores de somatostatina 2.
- Presencia de isoforma de receptores de somatostatina 3:
    - Variable: cualitativa.
    - Escala de medición: nominal
    - Unidad de medición: si/no.
    - Definición: positividad por inmunohistoquímica en las células tumorales.
    - Definición operacional: positividad por inmunohistoquímica en membrana según algoritmo diseñado para este propósito en software de microarreglos de isoforma de receptores de somatostatina 3.
- Presencia de isoforma de receptores de somatostatina 5:
    - Variable: cualitativa.
    - Escala de medición: nominal
    - Unidad de medición: si/no.
    - Definición: positividad por inmunohistoquímica en las células tumorales.
    - Definición operacional: positividad por inmunohistoquímica en membrana según algoritmo diseñado para este propósito en software de microarreglos de isoforma de receptores de somatostatina 5.
- Tamaño tumoral inicial:
    - Variable: Cuantitativa.
    - Escala de medición: Discontinua
    - Unidad de medición: mm
    - Definición conceptual: tamaño tumoral del MAHNF.
    - Definición operacional: medición en mm de cada eje tumoral (antero posterior, transverso y céfalo-caudal) en la imagen de resonancia magnética antes de la cirugía.
- Tamaño tumoral postquirúrgico
    - Variable: Cuantitativa.
    - Escala de medición: Discontinua.
    - Unidad de medición: mm
    - Definición conceptual: volumen tumoral del MAHNF.
    - Definición operacional: medición en mm de cada eje tumoral (antero posterior, transverso y céfalo-caudal) en la imagen de resonancia magnética, después de la cirugía de resección tumoral después de la cirugía.

- Tumor invasor
  - Variable: Cualitativa.
  - Escala de medición: nominal dicotómica
  - Unidad de medición: si/no
  - Definición conceptual: adenoma de hipófisis que invade estructuras adyacentes.
  - Definición operacional: MAHNF que invade seno cavernoso, suelo de la silla turca o tiene extensión supraselar.
  
- Producción hormonal
  - Variable: cualitativa
  - Escala de medición: nominal dicotómica
  - Unidad de medición: si/no
  - Definición conceptual: producción de hormonas o fragmentos de ellas a pesar de no tener un cuadro clínico específico.
  - Definición operacional: MAHNF que resultaron positivos para las inmunohistoquímicas de hormonas de hipófisis anterior a pesar de no tener un cuadro clínico derivado de esta producción hormonal.

### **Descripción del estudio**

Los pacientes en los que se haya corroborado diagnóstico de macroadenoma clínicamente no funcionante con estudios de laboratorio y resonancia magnética inicial, que hayan sido sometidos a tratamiento quirúrgico en nuestra unidad, serán invitados a participar.

Los pacientes serán informados de las implicaciones de su participación en el estudio y se les solicitará que firmen una carta de consentimiento una vez que han autorizado su inclusión en el estudio.

Durante el procedimiento quirúrgico, se envía de manera rutinaria el tumor al Servicio de Patología, en donde se incluye en parafina. Se recuperarán estas parafinas tanto de los pacientes recientemente operados como de los años previos. Se construirá un microarreglo de tejido con estos tumores y posteriormente se realizará IHQ, análisis de sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> y sst<sub>5</sub>. Como parte del estudio completo de los macroadenomas clínicamente no funcionantes, se solicitarán también inmunohistoquímicas para todas las hormonas de hipófisis anterior y sus subunidades, de manera que se pueda corroborar el origen del tumor y si se trata o no de un tumor con producción hormonal pero clínicamente silente, lo cual contribuye a una caracterización adecuada de nuestra población.

Se evaluarán las imágenes de resonancia de los pacientes antes del tratamiento quirúrgico inicial y postquirúrgico para determinar si hay remanente tumoral y el volumen del mismo como parte habitual del seguimiento de los

pacientes, así como seguimiento de niveles hormonales al momento del diagnóstico y cada 3 meses después de la cirugía.

### **Análisis estadístico**

Se utilizará estadística descriptiva, con medidas de tendencia central y de dispersión de acordes a la distribución de cada una de las variables.

Se utilizará chi cuadrada para las variables dicotómicas.

Debido a que no existen estudios previos similares no puede realizarse un cálculo del tamaño de la muestra, por lo que se realizará el estudio con todos los pacientes que cumplan los criterios de inclusión.

### **Factibilidad**

El Servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades CMN SXXI cuenta con un registro hasta el momento más de 300 pacientes con el diagnóstico de MAHNF, con 2 a 3 nuevos casos al mes. Se cuenta con una base de datos de los pacientes operados en nuestra unidad con diagnóstico de MAHNF en los tres últimos años que podrían ser incluidos como controles históricos en los que se podrá recuperar el tumor incluido en parafina para realizar la IHQ para sst2, sst3 y sst5.

Contamos con la infraestructura y los recursos humanos necesarios para captar y valorar a los pacientes en la consulta del servicio de Endocrinología. Del grupo de investigadores, solo dos Endocrinólogos se encuentran a cargo de la valoración en consultas iniciales y de seguimiento de todos estos pacientes. Esto se realiza en la Clínica de Hipófisis del servicio, que es la única consulta en donde se valora a estos pacientes en el servicio para evitar que se pierdan pacientes en la captura.

Contamos con la participación en el estudio de los servicios de Neurocirugía y de Patología para la atención integral de éstos pacientes y para garantizar la recolección del tejido tumoral y su adecuado manejo para la inmunohistoquímica.

También se cuenta con el apoyo de un pasante de Medicina General adscrito al Servicio Social en Investigación quien participará en la recolección del tejido en quirófano y en las técnicas de biología molecular para optimizar la obtención de tejidos.

Contamos con infraestructura y recursos humanos para realizar las técnicas de biología molecular en la Unidad de Investigación de Endocrinología, dentro del mismo Hospital de Especialidades en la UMAE SXXI, así como el apoyo de la Unidad de Patología Experimental de los Hospitales Princess Margaret Hospital y Toronto General Hospital quienes cuentan con el material para construir el microarreglo y realizar las inmunohistoquímicas.

En cuanto a recursos financieros, solicitaremos financiamiento por parte del FOFOI.



## REFERENCIAS

1. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev.* 1998;19:798-827
2. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest.* 2003;112:1603-1618
3. Pickett CA. Diagnosis and management of pituitary tumors: recent advances. *Prim Care Clin Office Pract.* 2003; 30: 765–789. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest.* 2003;112: 1603-1618.
4. Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, Melmed S. Structure, expression and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol.* 1999;13:156-66.
5. Jane JA, Laws ER. Management of non-functioning pituitary adenomas. *Neurol India.* 2003; 51: 461-5.
6. Jane JA, Laws ER. Surgical management of pituitary adenomas. *Singapore Med J.* 2002; 43: 318-23.
7. Iwai Y, Yamanaka K, Yoshioka K. Radiosurgery for nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery.* 2005; 56: 699-705.
8. Plowman, P. N. Pituitary adenoma radiotherapy-when, who and how? *Clinical Endocrinology.* 1999; 51: 265-271.
9. Yamada S, Ohyama K, Taguchi M, et al. A study of the correlation between morphological findings and biological activities in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery.* 2007; 61: 580-585.
10. Brada M, Ajithkumar TV, Minniti G. Radiosurgery for pituitary adenomas. *Clin Endocrinol.* 2004; 61: 531-543.
11. Andersen M, Bjerre P, Schroeder HD, et. Al. *In vivo* secretory potential effect of combination therapy with octreotide and cabergoline in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol.* 2001; 54: 23-30.
12. Harris PE. Biochemical markers for clinically non-functioning pituitary tumors. *Clin Endocrinol.* 1998; 49: 163-164.
13. Jaffe CA. Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary.* 2006; 9: 317-321.
14. Duet M, Ajzenberg C, Benelhadj S, et al. Somatostatin receptor scintigraphy in pituitary adenomas: A somatostatin receptor density index can predict hormonal and tumoral efficacy of octreotide *in vivo*. *J Nucl Med.* 1999; 40: 1252-7.
15. Borson-Chazot F, Houzard C, Ajzenberg C, et.al. Somatostatin receptor imaging in somatotroph and non-functioning pituitary adenomas: correlation with hormonal and visual responses to octreotide. *Clin Endocrinol.* 1997; 47: 589-598.
16. Kontogeorgos G. Predictive markers of pituitary adenoma behavior. *Neuroendocrinology.* 2006; 83: 179-188.
17. De Bruin TW, Kwekkeboom DJ, et al. Clinically non functioning pituitary adenoma and octreotide response to long term high dose treatment, and studies *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metabol* 1992; 75: 1310-1317.
18. Warnet A, Harris AG, Renard E. A prospective multicenter trial of octreotide in 24 patients with visual defects caused by nonfunctioning and gonadotropin-secreting pituitary adenomas. French Multicenter Octreotide Study Group. *Neurosurgery.* 1997; 41: 786-795.

19. Liuzzi A, Dallabonzana D, Oppizzi G. GIs there a real medical treatment for the 'non-secreting' pituitary adenomas? (abstract). *Journal of Endocrinological Investigation* 1991 14 (suppl. 1) 18.
20. Plockinger U, Reichel M, Fett U, et al. Preoperative octreotide treatment of growth hormone-secreting and clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas: Effect on tumor volume and lack of correlation with immunohistochemistry and somatostatin receptor scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994; 74: 1416–1423.
21. Ferrante E, Pellegrini C, Bondoni S, et al. Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. *Endocrine-Related Cancer*, 2006; 13: 955-962.
22. Colao A, Filippella M, Pivonello R, et al. Combined therapy of somatostatin analogues and dopamine agonists in the treatment of pituitary tumours. *Eur J Endocrinol*, 2007; 156: S57-S63.
23. Yoguesh P. Somatostatin and Its Receptor Family. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20(1999), 157–198
24. Reubi JC. Relevance of Somatostatin Receptors and other peptide receptors in Pathology. *Endocr Pathol*, 1997; 8(1): 11-20.
25. Reubi JC, Kappeler A, Waser B, et al. Immunohistochemical localization of somatostatin receptors sst2a in human tumors. *Am J Pathol*, 1998; 153(1): 233-245.
26. Fischer T, Doll C, Jacobs S, et al. Reassessment of Somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrin Metab*, 2008; 93(11): 4519-4524.
27. Asnacios A, Courbon F, Rochaix P, Bauvin E, Cances-Lauwers V, Susini C, Schulz S, Boneu A, Guimbaud R, Buscail L. Indium- 111-pentetreotide scintigraphy and somatostatin receptor subtype 2 expression: new prognostic factors for malignant well-differentiated endocrine tumors. *J Clin Oncol* 2008; 26:963-970.
28. Volante M, Brizzi MP, Faggiano A, La Rosa S, Rapa I, Ferrero A, Mansueto G, Righi L, Garancini S, Capella C, De Rosa G, Dogliotti L, Colao A, Papotti M. Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol* 20:1172-1182.
29. Grozinsky-Glasberg S, Grossman AB y Korbonits M. The role of somatostatin analogues in the treatment of neuroendocrine tumours. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Oct 13 [Epub ahead of print]
30. The Sandostatin Internacional Site for Healthcare professionals outside the US. <http://www.sandostatin.com/index.html?inside>
31. Miller G, Alexander JM, Bakkal HA, et al. Somatostatin Receptor Subtype Gene Expression In pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; 80: 1386-1392.
32. Pawlikowski M, Pisarek H, Kunert-Radek J. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes in "clinically nonfunctioning" pituitary adenomas. *Endocr Pathol*. 2003 Fall;14(3):231-8.
33. Van der Hoek J, Lamberts SW y Hofland LJ. Preclinical and clinical experiences with the role of somatostatin receptors in the treatment of pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*, 2003; 156: S45-S51.

34. Avninder S, Ylayka K y Hewitt SM. Tissue microarray: a simple technology that has revolutionized research in pathology. *J Postgrad Med*, 2008; 54: 158-162.
35. Liu X, Minin V, Huang Y, et al. Statistical methods for analyzing Tissue Microarray data. UCLA, Escuela de Medicina.
36. Takikita M, Chung JY, Hewitt JM. Tissue microarrays enabling high – throughput molecular pathology. *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18:318–325
37. Thodou E, Kontogeorgos G, Theodossiou D, et al. Mapping of somatostatin receptor types in GH or/and PRL producing pituitary adenomas. *J. Clin. Pathol*, 2006;59: 274-279.
38. Ma YY, Qi XF, Song SJ, et al. cDNA microarray reveals signaling pathways involved in hormones expression of human pituitary. *General and Comparative Endocrinology*, 2005; 143: 184–192.

## Anexo 1

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F. a \_\_\_\_\_

Por medio del presente, (nombre) \_\_\_\_\_ acepto participar en el proyecto de investigación, **“Distribución los Isotipos 2 y 5 del receptor de Somatostatina en Macroadenomas Hipofisarios Clínicamente no Funcionantes en una Población Mexicana”**, registrado ante el Comité Local de Investigación del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, con el número \_\_\_\_\_.

El objetivo de este estudio es identificar la presencia de receptores para somatostatina en el tumor que me fue resecado como parte de mi tratamiento habitual. Estoy enterado de que la presencia o ausencia de estos receptores podrían predecir la respuesta a algún tratamiento médico dirigido para ello, por lo que es importante realizar el estudio.

Se me ha explicado que mi participación en la investigación consiste en autorizar que se realicen análisis moleculares al tejido tumoral que se me extirpa durante la cirugía y que con los resultados obtenidos se forme un banco de datos y tejidos que podrían usarse para investigaciones relacionadas con este estudio.

Declaro que se me ha informado ampliamente que este estudio no implica ningún riesgo para mi salud, ni procedimientos adicionales a los habituales para mi enfermedad.

La información molecular obtenida es específica de las células del tumor (células transformadas) por lo que no se obtendrá mayor información genética de mi persona. No hay un beneficio personal inmediato de participar en este estudio, pero el beneficio a largo plazo con los resultados moleculares del estudio pueden ser un adelanto científico que mejore el manejo de otros pacientes con esta enfermedad.

Manifiesto que mi participación es voluntaria, sin remuneración económica y entiendo que conservo el derecho de negarme a participar en el estudio, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El investigador principal me ha asegurado que mis datos serán manejados en forma confidencial en las presentaciones o publicaciones de este estudio y que en todo momento se respetará mi privacidad.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Investigador

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

**Anexo 2****HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Hoja #: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

|            |  |      |   |   |
|------------|--|------|---|---|
| Nombre     |  | Sexo | M | H |
| Afiliación |  | Edad |   |   |

|  |        |       |          |
|--|--------|-------|----------|
| Tiempo de evolución con diagnóstico de MAHNF |        |       |          |
| Cirugía                                      | Número | Fecha | Abordaje |
|  |        |       |          |
|  |        |       |          |
|  |        |       |          |

|                |                    |    |   |    |  |
|----------------|--------------------|----|---|----|--|
| Tamaño tumoral | Diámetros          | CC | T | AP |  |
|                | Inicial            |    |   |    |  |
|                | Después de cirugía |    |   |    |  |

|                                    |                     |                       |
|------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Características Clínicas del MAHNF | Antes de la Cirugía | Después de la cirugía |
| Déficit campimétrico               |                     |                       |
| Cefalea                            |                     |                       |

Invasión a estructuras vecinas: si  no  ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

Descripción de patología:

Resultado de IHQ:

Positivo para sst2: si  no Positivo para sst3: si  no Positivo para sst5: si  no Positividad para hormonas o fracciones de ellas: si  no 

¿Cuáles? \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

### **Anexo 3**

#### **Especificaciones del microarreglador**

Nombre: TMArrayer™

Fábrica: Pathology Devices Inc™

Lugar y fecha de Origen: Westminster, EUA. 2005-2006

Voltaje: 100-240VAC, 5A, 47/65 Hz, 1.7A

Rango de movimiento: 90 mm x 90 mm

Velocidad: 30 mm / sec

Resolución posicional: 0.5 µm

Repetibilidad posicional: 1.5 µm

Tiempo promedio de movimiento: < 2.0 sec

Opciones de estilete: 0.6, 1.0, and 2.0 mm

Peso: 9.5 kg

Tamaño Largo x ancho x alto: 520 x 403 x 232 mm

Rango de temperaturas en las que opera: 25 – 35 °C

Rango de humedad permitida 0 – 85% sin condensación

Tiempo de calentamiento para estabilización: < 30 min. Pero depende de la temperatura de la habitación.

Temperatura de almacenaje: -30 a 70 °C

## Anexo 4

### Métodos de biología molecular

#### Inmunohistoquímica

1. Desparafinación.
  - a. Se secan las laminillas a 58-62°C por 1 hora
  - b. Se desparafinan con Xilol por 2 minutos (x2)
  - c. Se rehidratan con escalera de alcoholes (100%, 95%, 75%) 2 minutos (x2 cada uno).
  - d. Se sumergen las laminillas en agua corriente por 5 minutos.
2. Exposición de antígeno
  - a. Se sumergen las laminillas en buffer de citratos (0.01M, pH 6.0)
  - b. Se calientan en microondas por 5 minutos, poder 1.
  - c. Se sumergen en PBS-Tritón 1 minuto.
  - d. Se sumergen en PBS 1% 2 minutos.
3. Quemar peroxidasa endógena
  - a. Se sumergen las laminillas en solución de peróxido de hidrógeno 3% por 15 minutos
  - b. Se lavan en PBS por 2 minutos (x2)
4. Se incuban con péptido bloqueador (1:50) por 20 minutos.
5. Incubación con anticuerpo primario: se aplica a la dilución recomendada, y se incuba en una cámara húmeda a 4°C por 24 horas.
6. Se lavan con PBS por 2 minutos (x2).
7. Incubación con anticuerpo secundario: a temperatura ambiente por 30 minutos a la dilución recomendada.
8. Revelado: Aplicar solución de diaminobencidina (DAB) fresca por aproximadamente 2 minutos. Observar bajo el microscopio de luz hasta llegar a la intensidad adecuada de revelado. Detener la reacción con agua corriente.
9. Contrastar con hematoxilina, virar con carbonato de litio saturado.
10. Montar con resina. Secar por 24 horas horizontal.

**Anexo 5**

**ESPECIFICACIONES DE LOS ANTICUERPOS EMPLEADOS EN LAS  
INMUNOHISTOQUÍMICAS**

Marca: Advanced Targeting Systems

Lugar de Origen: Biocompare.com (EUA)

**Mouse anti Somatostatin receptor 5 (SSTr5) monoclonal antibody,  
uncojugated, clone (14) 3C6**

50 microgramos

2-10 microgramos por mililitro IHC

Monoclonal

IgM kappa

En PBS

Ratón anti humano

**Mouse anti Somatostatin receptor 1 (SSTr1) monoclonal antibody,  
uncojugated, clone (15F10)2D7**

50 microgramos

2-10 microgramos por mililitro IHC

Monoclonal

IgM kappa

En PBS

Ratón anti humano

## Anexo 6

### ESPECIFICACIONES DEL SOFTWARE EMPLEADO PARA EL ANÁLISIS

Analizador de imágenes: SlideScanner

Marca: Aperio, ScanScope XT

Capacidad: 120 laminillas

Aumentos: 20 y 40x'

Velocidad: 15x15 mm menos de 2 min

Laminillas: 25 x 75 mm

Objetivo: 20x/0.75 Plan Apo

Resolución: 20x: 0.50  $\mu\text{m}/\text{pixel}$

40x: 0.25  $\mu\text{m}/\text{pixel}$

Compresión de imágenes a: JPG

Área de escaneo: 26.3 x 54 mm

Dimensiones: 597 x 406 x 648 mm

Peso: 47.6 kg

Monitor: 24" alta resolución LCD (1920 x 1200)

Uso de energía: AC 100-240, 50/60 Hz



Software: Spectrum™ 9

Digital Pathology Information Management System, integrado en el sistema Aperio.

