

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**SECRETARÍA DE SALUD**



**PROYECTO: “FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR  
COMO PREDICTOR DE RECURRENCIA EN ADENOMAS DE HIPÓFISIS EN  
EL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL  
VELASCO SUÁREZ”**

PARA OBTENER EL GRADO: MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:  
ALUMNO: Dra. Sara Patricia Pérez Reyes  
Neurocirugía  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

TUTOR: Dra. Lesly Aminta Portocarrero Ortiz Neuroendocrinología.  
MSci. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores.  
Profesor titular de curso de alta especialidad Neuroendocrinología  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## EQUIPO PARTICIPANTE

Dra. Francisca Pérez Severiano  
Laboratorio de neuroquímica  
Área de apoyo: Técnicas de Western Blot  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

Dra. Verónica Anaya Martínez  
Laboratorio de neurofisiología  
Área de apoyo: Técnicas de inmunohistoquímica  
UNAM FES- Iztacala, CINVESTAV

Dr. Jesús Cienfuegos Meza  
Área de apoyo: análisis estadístico  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

Dr. Alexander Perdomo Pantoja  
Residente de 3er año de neurocirugía  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

Dra. Sandra Aideé Gómez Acosta  
Médico pasante de servicio social.  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

## ANTECEDENTES

Los adenomas de hipófisis son tumores monoclonales que derivan de las células de la adenohipófisis, representan 10-15% de todos los tumores intracraneales y son los tumores más frecuentes de región selar (1, 2), se encuentran como lesiones incidentales en 3-24% de las autopsias (3). Aunque se consideran benignos, 25-55% de estos tumores son invasores y presentan un comportamiento clínico agresivo (4, 5, 6). No existe una clara definición de adenomas agresivos, clínicamente se consideran agresivos aquellos tumores que invaden estructuras circundantes (rápido crecimiento, gran tamaño, tendencia a la recurrencia, resistencia a tratamientos convencionales), el pronóstico es incierto y las opciones terapéuticas no están bien definidas (7,8, 9, 10).

## HISTOLOGÍA

La adenohipófisis consta de 5 tipos de células secretoras (somatotropos, lactotropos, corticotropos, tiotropos y gonadotropos). Se distinguen funcionalmente por su capacidad de secretar hormona de crecimiento (HC), prolactina (PRL), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona estimulante de tiroides (TSH) y gonadotropinas [(hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)].

Los somatotropos constituyen: 50%, lactotropos: 25%, corticotropos: 10-20% tiotropos :10%, gonadotropos: 10% (11, 12).

## CLASIFICACIÓN

Existen diversas clasificaciones, las más utilizadas son de acuerdo a tamaño, producción hormonal, invasión e inmunohistoquímica.

**1) TAMAÑO:** microadenomas <10mm, macroadenomas ≥10mm , adenomas gigantes: diámetro >4cm (ó volumen mayor a 10cm<sup>3</sup>) (11).

### **Invasión:**

- intraselar: confinados a la silla turca, sin erosionarla, no presentan extensión paraselar
- difusos: tumores de mayores dimensiones, llenan por completo la silla turca, pero no la erosionan
- Invasivos: erosionan la silla con extensión a estructuras adyacentes: seno esfenoidal, seno cavernoso, tercer ventrículo, extensión intradural
- Carcinoma: presentan metástasis, constituyen <1% (11).

**2) PRODUCCIÓN HORMONAL:** se clasifican en funcionales y no funcionales.

**A) Adenomas funcionales:** producen síndromes clínicos debido a la sobreproducción hormonal, se clasifican de acuerdo a la hormona que producen (tabla 1)

<b>Adenomas funcionales</b>	<b>Síndromes asociados</b>
Prolactinoma	Forbes Albright CastilloAhumada
Productor de HC	Acromegalia
Productor de ACTH	Cushing
Productor de TSH	Hipertiroidismo hipofisiario

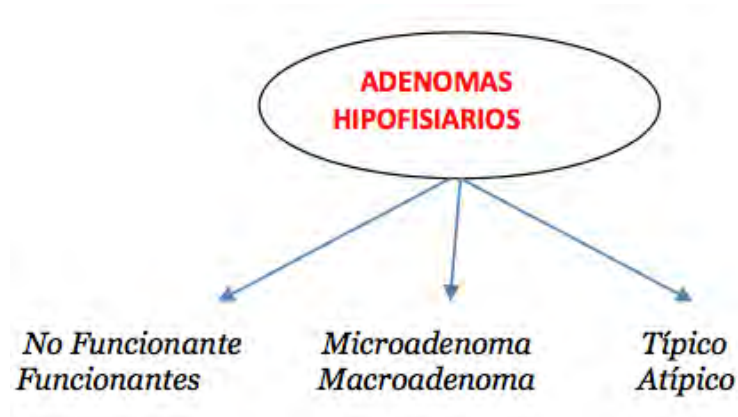
**Tabla I** Síndromes derivados de la sobreproducción hormonal. (PRL = Prolactina, HC= hormona del crecimiento, ACTH= hormona adrenocorticotropa, TSH= hormona estimulante de tiroides)

**B) Adenomas no funcionales:** no se asocian a evidencia clínica ó bioquímica de hipersecreción hormonal y por tanto no hay síndromes asociados, generalmente alcanzan grandes dimensiones, presentando manifestaciones clínicas por compresión a estructuras vecinas (11, 12, 13)

**3) INMUNOHISTOQUÍMICA:** propuesta por la OMS en 2004 con la finalidad de correlacionar un comportamiento clínico agresivo con el comportamiento biológico, se definen 3 categorías:

- adenoma típico: lento crecimiento, comportamiento benigno,
- adenoma atípico: Ki67 >3%, alto índice mitótico, alta inmunorreactividad p53.
- carcinoma presenta las mismas características del adenoma atípico + presencia de metástasis sistémicas y/o líquido cefalorraquídeo (LCR) (14).

La inclusión del adenoma atípico correlaciona con la agresividad de acuerdo a los marcadores antes comentados, y sirve como intermediario entre el adenoma típico y el carcinoma, cuya única diferencia con este último sería la presencia de metastasis (14).



## TRATAMIENTO

El tratamiento primario de todos los adenomas funcionales con excepción de los prolactinomas es quirúrgico, debido a la morbi-mortalidad derivada de la sobreproducción hormonal (15).

El tratamiento de elección de los adenomas hipofisarios no funcionales es quirúrgico cuando son lesiones >1cm y presentan sintomatología asociada, principalmente alteraciones visuales (16). El tratamiento quirúrgico de elección es mediante abordaje transesfenoidal, típicamente se ha utilizado el microscópico, con tasas de resección total de 35-74%, con bajas tasas de morbimortalidad (morbilidad <5%, mortalidad <1%).

En los últimos 15 años han existido grandes avances en la técnica endoscópica, con ventajas de visualización que permiten mayores resecciones, siendo actualmente la técnica de elección en muchos centros neuroquirúrgicos (15, 16).

La cirugía transcraneal es cada vez menos utilizada debido a que tiene mayor índice de complicaciones, se reserva para casos recidivantes y con gran extensión supra y paraselar.

A pesar de los constantes avances de las técnicas quirúrgicas, debido a la gran extensión supraselar e invasión de estructuras que presentan, en ocasiones no es posible realizar resecciones totales de la lesión, y la cirugía por sí sola no es curativa, quedando remanentes tumorales que requieren vigilancia a largo plazo, y necesidad de tratamientos secundarios (16).

La tasa reportada de resección completa de adenomas mediante vía transesfenoidal (endoscópica y microscópica) varía del 50 al 80% (16, 17). Las tasas de residuales reportadas varían de 12 a 58% de acuerdo a las distintas series (16, 18, 19).

## **PANORAMA INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO SUÁREZ Y ADENOMAS HIPOFISIARIOS**

Los adenomas de hipófisis representan la segunda causa de hospitalización en neurocirugía. En un análisis de la casuística de adenomas hipofisarios del 2000 al 2013 por el servicio de Neuroendocrinología (LPO), en promedio 150 pacientes reciben tratamiento quirúrgico por año, representando uno de los centros con mayor número de casos a nivel mundial.

En otro estudio comparativo también realizado en la Institución, se compararon los resultados quirúrgicos obtenidos en adenomas de hipófisis tratados con técnica endoscópica y microscópica, documentándose resección total en 46% y 35%, respectivamente, resaltando la existencia de un importante porcentaje de residuales asociados a progresión tumoral y necesidad de tratamientos secundarios. De acuerdo a este estudio se encontró recurrencia tumoral en 20%.

### **RADIOTERAPIA EN ADENOMAS DE HIPÓFISIS**

Terapia de segunda línea. Su principal indicación es la presencia de remanente tumoral posterior a cirugía, esto es común cuando existe invasión a seno cavernoso, que es una de las áreas de más difícil acceso debido a la localización anatómica per se, sin embargo aunque es bien demostrada su eficacia, no tiene un efecto inmediato, ni libre de efectos secundarios. (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33).

### **MODALIDADES DE RADIOTERAPIA**

Radioterapia convencional: control tumoral a 10 años de 87-90% .

Radioterapia estereotáctica: en sus modalidades fraccionada ó Radiocirugía (SRS, dosis única) dependiendo tamaño tumoral (<3cm= radiocirugía), presenta ventajas en cuanto a la radioterapia convencional: mejor precisión, menor irradiación de estructuras vecinas, con una efectividad de 87-100% en SRS con seguimiento de 6-60 meses (21, 22, 23, 24, 25, 26) en RTEF se reporta control tumoral de 87-90% (27, 28, 29, 30, 31, 32, 33).

Sin embargo aunque está bien establecida la utilidad de la radioterapia en sus distintas modalidades, la selección de pacientes debe equiparar la agresividad tumoral propuesta, conociendo los potenciales efectos adversos, entre ellos: hipopituitarismo, disfunción cognitiva, enfermedad cerebrovascular, neuropatía óptica. La complicación más frecuente reportada ha sido el hipopituitarismo (frecuencia global 20%), el cual, incluso puede presentarse hasta 20 años posterior a la radiación, aunque la máxima frecuencia estimada es durante el 1er año (20).

### **TRATAMIENTO MÉDICO**

Los adenomas funcionales que producen GH, prolactina, ACTH ó TSH pueden ser tratados con distintos medicamentos, antes ó después de cirugía. Los agonistas dopaminérgicos (AD) son el tratamiento de elección en pacientes con prolactinomas (34).

Los ADHNF tienen como tratamiento de primera línea cirugía y/o radioterapia en sus distintas modalidades (34). Sin embargo, en la última década, se ha reconocido que los adenomas no funcionales expresan a nivel de sus membranas diversas cantidades de los diferentes subtipos de receptores de dopamina, lo que ha llevado a realizar varios estudios clínicos valorando la eficacia de los agonistas dopaminérgicos, reportándose en promedio alrededor de 50% (35, 36).

Existen algunos reportes del reconocimiento de VEGF en adenomas funcionales no funcionales carcinomas, de tal forma que se ha propuesto a los antagonistas de VEGF (bevacizumab) como un posible nuevo blanco terapéutico. (37, 38)

## **PROLACTINOMAS**

Presentan una alta expresión de receptores dopaminérgicos (D2R), el tratamiento de elección es con agonistas dopaminérgicos (AD). Existen 3 AD que han sido utilizados: cabergolina, bromocriptina y quinagolida.

El que ofrece mayor beneficio, por los resultados en control tumoral, menor presencia de efectos adversos y costo es cabergolina, reportándose en promedio control tumoral en 90% (39, 40, 41, 42).

## **ADENOMAS PRODUCTORES DE HORMONA DE CRECIMIENTO (HC)**

La cirugía es el tratamiento de primera elección con tasas de remisión del 60-80% (43). Para el tratamiento médico los que han demostrado mayor utilidad son los análogos de somatostatina (AS), esto debido a la expresión de los distintos receptores de somatostatina (SST1, SST2, ST3, SST4, SST5) (42, 44, 45). Ocreótido y lanreótido son AS de acción larga, se unen principalmente a SSTR2, seguido SSTR5 y SSTR1. La eficacia real en control de HC e IGF-1 aún es objeto de debate, dada la heterogenicidad de los diferentes estudios (42, 44, 45). En un metaanálisis reciente, Carmichael et al, reportan normalización de HC en 56% y 55% para IGF-1 (26, 27). Sin embargo utilizando criterios bioquímicos estrictos (HC posterior a curva de tolerancia de glucosa  $\leq 2.5$  g/L y normalización de IGF-1 para edad y género) (46, 47), Colao et al reportan una tasa de control de 35% posterior a 1 año de tratamiento. Un estudio multicéntrico fase III evaluó la eficacia y seguridad de ocreótido por vía oral en 155 pacientes acromegálicos, reportando control bioquímico en 65% (niveles IGF-I  $< 1.3$  ULN y promedio de 2 concentraciones de HC  $< 2.5$  ng/mL) (27). Pasireotido (SOM230) presenta una alta afinidad a SSTR2, SSTR1, SSTR3 y SSTR5. Se ha reportado una tasa de control a 12 meses de 31.3% (48).

Los AD son otra alternativa médica, esto puede explicarse por la alta expresión de D2R en adenomas productores de HC. Chanson et al (29) reportan el uso de cabergolina como monoterapia (dosis promedio  $2.66 \pm 1.78$  mg/semana), con normalización de niveles de IGF-1 en 34% (49, 50).

Pegvisomant, un antagonista de HC, se ha reportado normalización de niveles de HC, sólo ó en combinación con AS (51).



## **ADENOMAS PRODUCTORES DE ACTH**

El tratamiento de primera línea es quirúrgico. Las tasas de remisión posterior a cirugía van del 60-90% con tasas de recurrencia de 10-35%. (52).

Tratamientos de segunda línea: utilidad: posterior a cirugía fallida, ó cuando ésta no es posible realizarse.

Tipos de tratamiento de segunda línea: radioterapia, adrenalectomía bilateral y tratamiento médico representan tratamientos de segunda línea (52). El tratamiento médico actual puede clasificarse en 3 grupos: 1) medicamentos dirigidos como blanco a hipófisis (análogos de somatostatina, agonistas dopaminérgicos y terapia combinada), 2) bloqueadores adrenales y 3) bloqueadores de receptores de glucocorticoides. Los resultados han sido diversos, en parte debido a la heterogeneidad de los estudios y metodología empleada (52, 53).

## **RECURRENCIA Y PROGRESIÓN TUMORAL**

Recurrencia se define como el recrecimiento tumoral posterior a una resección completa, tiene una incidencia de 6-21%, teniendo como pico de incidencia los primeros 5 años posterior a la primera cirugía sin embargo puede presentarse incluso posterior a 10 años.

Progresión tumoral se refiere a un aumento de tamaño tumoral posterior a una resección incompleta, parece ser un evento propio de la patogénesis tumoral con tasas reportadas de 39 a 75%, y está asociado con: Ki67 >3%, alta inmunorreactividad p53, alto índice mitótico, invasión a seno cavernoso (54)

El manejo de recurrencia y progresión tumoral de adenomas de hipófisis requiere un equipo multidisciplinario, con la finalidad de lograr mejores resultados y disminuir la morbilidad en el paciente. (54)

El conocimiento de las diferentes vías moleculares implicadas en la génesis tumoral de los adenomas de hipófisis y los avances en técnicas de laboratorio han permitido categorizar y reconocer distintos marcadores tumorales que se asocian a un comportamiento agresivo, permitiendo un manejo enfocado en la propia biología del tumor (54).

## **MARCADORES TUMORALES**

Se han investigado muchos posibles marcadores, alteraciones cromosómicas, marcadores de proliferación, oncogenes, genes supresores tumorales, factores de crecimiento, receptores, factores de angiogénesis y de adhesión celular. Hasta el momento, ningún marcador por sí solo ha sido considerado como un predictor independiente de comportamiento agresivo ni predictor de recurrencia (54, 55, 56, 57).

### **A) Factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y sus receptors (FGFRs)**

Son una familia de ligandos y receptores que regulan crecimiento, desarrollo,

proliferación, diferenciación, migración y angiogénesis. Los FGF básicos (factores de crecimiento fibroblastos) (FGF2, bFGF) fueron descritos originalmente en hipófisis bovinas.

Los niveles sanguíneos altos de mRNA FGF correlacionan con adenomas hipofisiarios agresivos.

Los 23 ligandos pertenecientes a FGF actúan a través de receptores tirosin-cinasa transmembrana.

FGFRs son expresados en una gran variedad de neoplasias, incluyendo mama, ovario, gástrico, colon y recto, próstata, páncreas, melanomas, neoplasias gliales.

En los adenomas de hipófisis se han encontrado alteraciones en subtipos e isoformas de FGFRs, las 2 mayores alteraciones son la pérdida de FGFR2 con la resultante sobre regulación MAGEA3 y FGFR4 (isoforma truncada a nivel N-terminal) conocida como ptdFGFR 4 (pituitary tumor derived).

In vivo la expresión de ptd-FGFR4 induce un crecimiento invasivo con pérdida de la expresión de N-cadherina.

La integridad del sistema FGFR4/NCAM/N-cadherina- $\beta$  catenina es necesario para mantener el fenotipo normal de las células neuro-endócrinas con la matriz extracelular (55, 56, 57).

### **B) Metaloproteinasas de matriz (MPM)**

Familia de cadenas simples de zinc que contienen enzimas proteolíticas que regulan las acciones de la matriz extracelular. Han sido descritas 8 clases y 24 tipos. *Se ha reconocido la secreción de MPM en tumores invasivo*, constituyendo a su vez, una importante fuente enzimática en el desarrollo tumoral. MM-9 ha sido la más vinculada en adenomas de hipófisis, sin embargo no hay resultados concluyentes (55, 56, 5, 587).

### **C) Alteraciones cromosómicas**

Las alteraciones numéricas en cromosomas son comunes en todos los tipos de ADH. Los cromosomas 8 y 12 presentan alteraciones numéricas en todos los tipos de ADH, y han sido involucrados en la patogénesis tumoral; las alteraciones numéricas en cromosomas 9, 11, 19 han sido asociadas con adenomas invasores (59).

### **D) Pituitary Tumor Transforming Gene (PTTG)**

PTTG es miembro de la familia que regula la separación de las cromátides hermanas durante la mitosis. La familia PTTG en humanos involucra al menos 3 genes, PTTG1, PTTG2, PTTG3, los cuales son órgano-específicos y se relacionan con génesis tumoral, transformación celular, reparación de DNA y angiogénesis. Los niveles más altos de PTTG se han encontrado en adenomas productores de hormona de crecimiento y prolactinomas (55, 56, 57).

### **E) Ki67 (identificado con anticuerpo MIB-1)**

Marcador de división celular, utilizado para evaluar el índice proliferativo en

neoplasias (Ki labeling index, LI). Se ha identificado como factor pronóstico en tumores neuroendócrinos. En varios estudios, se ha encontrado una asociación con LI (labelinx index ki67) y el grado de invasividad. La presencia de un alto índice de ki67 es un sinónimo de proliferación acelerada. Se ha determinado como punto de corte un índice de ki67 >3% (invasivo), <3% (no invasivo), con una especificidad 97%, y una sensibilidad de 73%, con un valor predictivo positivo y negativo, de 96% y 80% respectivamente. Pizarro y colaboradores reportaron que los adenomas invasores (LI Ki67 2.01 +- 3.15) tienen un índice Ki67 significativamente mayor que los macroadenomas (LI Ki67 1.12-1.87) (55, 56, 57).

## **F) P53**

Supresor tumoral codificado por el gen TP53. Importante papel en proliferación, apoptosis y estabilidad génica. La expresión de p53 se ha asociado a tumores hipofisarios agresivos, se ha determonado su asociación con adenomas de hipófisis en 3 grupos: adenomas no invasivos, invasivos y carcinomas, correlacionando la expresión de p53, la cual fué 0%, 15.2%, y 100% respectivamente.

Sin embargo por la gran variabilidad y las dificultades técnicas para realizarse, p53 no ha podido establecerse como un factor predictor independiente de comportamiento biológico agresivo de adenomas de hipófisis (55, 56, 57).

## **G) MicroRNAs**

Regulan la expresión genética a nivel post-transcripcional mediante clivaje directo de RNAm ó bien mediante la inhibición de la síntesis de proteínas, también pueden actuar como genes supresores tumorales u oncogenes. La expresión aberrante de miRNA ha sido ligada a neoplasias pituitarias, sin embargo no se ha podido realizar correlaciones significativas (55, 56).

## **H) FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)**

La angiogénesis es un paso esencial en la formación de tumores sólidos, permitiendo el crecimiento tumoral y determinando el comportamiento biológico.

En el proceso de angiogénesis interviene un balance entre estimuladores e inhibidores, las citocinas y factores de crecimiento son reconocidas como importantes moduladores de este proceso.

Uno de los principales moduladores es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, Vascular Endotelial Growth Factor).

Pertenece a la familia de factores de crecimiento angiogénicos y linfangiogénicos, comprenden 6 glicoproteínas, su forma madura es un polipéptido homodimérico de 45kDa que juega un papel pivote como estimulador angiogénico, estimulando la proliferación celular, migración y proliferación vascular, las acciones biológicas están mediadas por 2 receptores tirocin-cinasa: VEGFR2 (Flk-1/KDR) y VEFGR1 (Flt-1); VEGFR2 realiza las acciones biológicas, VEFGR1 funciona como modulador (60, 61, 62, 63, 64, 65).

Los estudios de angiogénesis en adenomas hipofisarios han mostrado resultados discordantes.

Estudios iniciales reportaron menor vascularización en adenomas de hipófisis comparados con hipófisis normal (66, 67).

Posteriormente se encontró la presencia de vasos de neoformación aberrantes, con distintos grados de expresión dependiendo el tipo de adenoma. Por otra parte, existen estudios que reportan mayor expresión de VEGF en adenomas no funcionales comparados con hipófisis normal (36, 68). Algunas de estas discrepancias pueden ser explicadas en base a la metodología empleada.

Se señalan los estudios que evalúan la presencia de VEGF en adenomas hipofisarios:

ESTUDIO	CASOS	SUBTIPO	CORRELACIÓN
Lloyd et al, 1999 (37)	148	Mayor expresión en carcinomas	Ninguna
Luchi et al, 2000 (70)	25		Mayor proliferación
McCabe et al, 2002(67)	103	Mayor expresión en ADHNF comparado con hipófisis normales	PTTG
Niveiro et al, 2005 (68)	60	Mayor expresión en ADHNF, menor en PRL	Edad avanzada
Pan et al, 2005 (69)	45	Mayor expresión en adenomas invasores	
Cristina et al, 2010 (71)	56	Mayor expresión en ADHNF y PRL	Ninguna KDR >0.750 menor periodo libre de recurrencia p=0.032, VEGF y crecimiento extraselar (p=0.002)
Sánchez-Ortiga et al, 2012 (65)	46	Mayor expresión en ADHNF	
Wang et al, 2014 (72)	197	Mayor expresión en ADHNF	Ninguna

Tabla 2.- Correlación clínico-patológica con expresión de VEGF y adenomas de hipófisis

## AGRESIVIDAD E INVASIVIDAD EN ADENOMAS DE HIPÓFISIS

La clasificación de OMS de adenoma típico y atípico no correlaciona en ocasiones con el comportamiento clínico, algunos adenomas considerados como típicos tiene un fenotipo agresivo, y algunos adenomas atípicos no presentan un comportamiento clínico agresivo ni presentan recurrencia (14).

Aunque los adenomas clínicamente agresivos, a diferencia de los carcinomas no presentan metástasis pueden mostrar características histológicas muy similares a los carcinomas.

La identificación de adenomas agresivos debe ser identificada lo más temprano posible, ya que los pacientes con estos tumores requieren un seguimiento clínico y radiológico continuo y es necesario en la gran mayoría de los casos un tratamiento multimodal (4, 5, 6, 7, 8, 9, 14).

A pesar de la importancia de la identificación de criterios específicos de agresividad, no ha sido posible estandarizar marcadores clínicos, histológicos o

radiológicos (14, 34).

Los últimos criterios de OMS definen a los adenomas de hipófisis de acuerdo a sus características histológicas, sin embargo no se ha podido correlacionar ningún marcador histológico ó sistema de clasificación para definir la agresividad de estos tumores (34). Esta ausencia de correlación entre biomarcadores y comportamiento clínico también se presenta en parte debido a la falta de estandarización de terminología ya que en la literatura actual es común la utilización del término “agresivo” como sinónimo de “invasivo” , lo cual no es correcto (34).

Los adenomas de hipófisis “agresivos” representan una distinta entidad, de tal forma que es necesario la identificación de criterios diagnósticos específicos. La tendencia de las investigaciones actuales es la definición de criterios de agresividad, no sólo desde el punto de vista clínico, sino también en base a criterios moleculares, radiológicos y biomarcadores histológicos (14, 34).

### **Criterios de invasividad:**

De acuerdo a datos publicados, 25-55% de los adenomas de hipófisis invaden estructuras circundantes (4, 5, 6, 14). Hardy fue el primero en intentar clasificar los adenomas invasores, de acuerdo a esta clasificación los grados III y IV son invasores (73). Hardy demostró que la porción supraselar del tumor está rodeada de tejido hipofisario no tumoral y no considerará la extensión supraselar como invasividad. De hecho, la extensión supraselar de los tumores de hipófisis está relacionada con las características anatómicas locales de la región selar ( localización del adenoma en relación con la glándula, tamaño de apertura del diafragma selar, presencia y tamaño de cisterna subdiafragmática). La invasión microscópica es muy común y no es considerada como indicador de agresividad (73). El incremento de grado de los adenomas de hipófisis correlaciona con la invasión del seno cavernoso, siendo éstos grado 3 y 4 (73), lo cual también se asocia a Knosp >3 (74). Los adenomas invasores son macroadenomas en general. Sin embargo, aunque los macroadenomas y adenomas gigantes son altamenete invasores, en mchos pacientes no se encuentran características histopatológicas de agresividad (34, 73).

■ Invasión del seno esfenoidal y/o seno cavernoso
■ La extensión supraselar no debe ser considerada como un criterio
■ De acuerdo a la clasificación de Hardy los adenomas invasores son únicamente adenomas grado III (erosión ósea focal) y IV (extensa erosión ósea e invasión de estructuras paraselares)
■ Knosp >3
■ Los macroadenomas pueden ser invasores, más no es sinónimo de agresividad clínica

**Tabla 3.-** Resumen criterios de invasión en adenomas de hipófisis

### **Criterios de agresividad:**

Los adenomas de hipófisis clínicamente agresivos pueden ser microadenomas, macroadenomas, invasores ó no invasores, una de las principales características es que presentan una alta tasa de recurrencia.

La clasificación de OMS del 2004 que divide estos tumores en adenoma típico, atípico y carcinoma, considera marcadores histopatológicos, sin embargo no toma en cuenta las características clínicas, correlaciones radioanatómicas ni características ultraestructurales (14, 34).

En base a dicha clasificación, los adenomas atípicos y adenomas clínicamente agresivos pueden tener la misma presentación (clínica, radiológica, hormonal), sin embargo existen características distintivas en aquellos con comportamiento clínico agresivo, como es el caso de prolactinomas que está bien establecido un comportamiento más agresivo en hombres y resistencia al tratamiento con agonistas dopaminérgicos (76, 77, 78).

Existen además ciertas características histopatológicas que se han relacionado con agresividad, como son los adenomas compuestos por células de Crooke (79, 80), adenomas corticotropos silentes (81), adenomas productores de hormona de crecimiento escasamente granulares y algunos adenomas productores de gonadotropinas (82, 83, 84).

Aunque no ha sido posible establecer una clasificación estandarizada para definir la agresividad de estos tumores, es clara la necesidad de una clasificación multimodal, tomando en cuenta características morfológicas, moleculares, clínicas y radiológicas, lo cual tiene un papel primordial en pronóstico y tratamiento. La búsqueda de biomarcadores que nos permitan un diagnóstico temprano es de crucial importancia en la práctica actual (34, 82).

<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Deberán basarse en el comportamiento clínico en primer lugar</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Expresan características atípicas (alto índice mitótico, Ki-67 <math>\geq</math>3%, inmunorreactividad positiva p53)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ En general son macroadenomas ó adenomas gigantes, existen algunas excepciones como microadenomas agresivos productores de ACTH</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Comparten características histológicas con carcinomas, aunque no presentan metástasis.</li> </ul>

**Tabla 4.-** Resumen criterios de agresividad en adenomas de hipófisis

Por todos los antecedentes previamente mencionados, surge el interés de estudiar el VEGF y su receptor (KDR), evaluando la relación con características clínicas, radiológicas e histopatológicas, considerando que los adenomas de hipófisis requieren para crecimiento progresión y recurrencia tumoral la existencia de angiogénesis, de tal forma que podrían representar un probable predictor comportamiento agresivo además de ser un posible blanco terapéutico.

## **1.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿ Existe asociación entre la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular y su receptor (KDR) con progresión y recurrencia tumoral en adenomas de hipófisis?

## **2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

No se conoce un predictor de progresión y recurrencia en adenomas de hipófisis.

Hasta el momento, no se ha determinado la presencia de ningún factor predictor independiente de comportamiento clínico agresivo que además pueda representar un blanco terapéutico.

La frecuente presencia de progresión y recurrencia en estos tumores requiere tratamientos secundarios los cuales no están libres de posibles efectos adversos además del costo económico que representan y no están justificados en todos los casos.

## **3.- HIPÓTESIS**

- El grado de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se asociará a progresión y recurrencia en adenomas de hipófisis

## **4.- OBJETIVO GENERAL**

- Cuantificar la expresión de VEGF y su receptor KDR en adenomas de hipófisis y comparar la relación con recurrencia y progresión tumoral.

## **5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Describir las características de los adenomas de hipófisis por imagen de resonancia magnética (IRM), mediante clasificación Hardy-Vezina, clasificación de Knosp para invasión a seno cavernoso y volumetría
- Correlacionar el tamaño tumoral con la expresión de VEGF
- Correlacionar la expresión de VEGF y su receptor VEGF-2/Flk 1
- Comparar el valor de VEGF respecto a ki67 en cuanto a recurrencia y agresividad tumoral

## **6.- JUSTIFICACIÓN**

Los adenomas de hipófisis representan una de las patologías más frecuente en nuestra Institución, son la segunda causa de internamiento en neurocirugía, son difícilmente curables únicamente con cirugía debido a las grandes dimensiones que suelen alcanzar, incluso tras resección total no es infrecuente la presencia de recurrencias que suelen requerir tratamientos secundarios.

La radioterapia en sus distintas modalidades es uno de los tratamientos secundarios más reconocidos, sin embargo no se encuentra libre de efectos secundarios, y aún con estas 2 modalidades de tratamiento, es frecuente que



no se logre el control tumoral.

Ki67 ha sido el marcador que ha mostrado resultados más reproducibles, al expresarse en las fases activas del ciclo celular nos habla de un crecimiento acelerado y probable invasividad, sin embargo esto no es sinónimo de recurrencia.

El factor de crecimiento edotelial vascular (VEGF) es el principal mediador de la angiogénesis, sin lo cual, ningún tumor sólido podría crecer más allá de 3mm, de tal forma que podría representar un mejor marcador tumoral, proporcionando información de la propia biología tumoral e incluso ser un blanco terapéutico, lo cual podría conferir ventajas respecto a otros marcadores.

El conocimiento de un predictor independiente de agresividad y recurrencia, basado en la propia patogénesis tumoral de los adenomas de hipófisis podrá permitir plantear mejores opciones terapéuticas.

## 7.- METODOLOGÍA

**A) Diseño:** Estudio prospectivo, observacional

**B) Población:** todos los pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía con diagnóstico de adenoma de hipófisis sometidos a tratamiento quirúrgico en el periodo comprendido del 1 de enero al 31 de diciembre de 2013.

**C) Captación de muestras:** se obtuvieron muestras de tejido fresco de pacientes con diagnóstico de adenoma de hipófisis en el periodo mencionado. Las muestras fueron procesadas con técnica de Western Blot (WB) e inmunohistoquímica.

**D) Análisis Histopatológico de muestras recolectadas:**

Se realizarán cortes histológicos de 4 micras, con un microtomo de rotación (American Optical), los cuales serán montados en portaobjetos previamente tratados con Poli-L-Lysina para adherirlos bien. En estos cortes se realizará la técnica de inmunohistoquímica empleando anticuerpos específicos contra las hormonas adenohipofisarias (prolactina, hormona de crecimiento (GH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de tiroides (TSH) [BioGenex San Ramón Ca.], hormona adrenocorticotrópica (ACTH [Dako, Carpintería Ca] ). Los cortes serán sometidos a un proceso de desparafinado en series de xilol y concentraciones graduales de alcohol hasta agua; posteriormente serán recuperados en una olla de presión en un buffer de recuperación (Diva Decloaker, BioCare Medical, Concorde Ca). Se pondrán en el anticuerpo primario por 1 hr y posteriormente serán lavados. La reacción será detectada por el método de estreptavidina-biotina y revelados con Diaminobencidina (BioGenex San Ramón Ca).

El conteo de mitosis por campo se realizará con laminillas con microscopio 40x. La expresión Ki67/índice MIB-1, se realizará con cortes de 4 micras con microtomo del espécimen patológico, posteriormente se someterán dichos cortes por 10 minutos a solución buffer citrato a pH 6.6, la detección por inmunohistoquímica se realizó con el kit ChemMate (DAKO) y

diaminobenzidina como cromógeno.

### **E) Procedimiento Western Blot**

Se obtuvieron muestras de adenomas de hipófisis, los cuales fueron recolectados en nitrógeno líquido y trasladados inmediatamente a refrigeración a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Cada muestra fue homogeneizada en 250  $\mu\text{L}$  de una mezcla de inhibidores de proteasas disueltos en buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma, Co), pH 7.5). La mezcla de inhibidores fue preparada con las siguientes concentraciones finales: 100  $\mu\text{M}$  de leupeptina, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de aprotinina, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de inhibidor de tripsina de soya (SBTI) y 0.1% v/v de Nonidet P-40 (Sigma, Co). Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry, con lectura de absorción de 540 nm. Para la obtención de la curva de calibración del método de cuantificación de proteínas de Lowry se colocaron en una gradilla siete tubos de ensayo de 10 mL y con las micropipetas adecuadas, se adicionaron a cada uno de ellos los volúmenes de la solución patrón albúmina y agua destilada. El volumen de homogenado que contenía 500  $\mu\text{g}$  de proteína fue incubado durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en presencia de los siguientes cofactores (todos a concentraciones finales en un volumen máximo de reacción de 100  $\mu\text{l}$ ): 1 mM NADPH, 100 nM de calmodulina, 30  $\mu\text{M}$  de tetrahidrobiopterina (Sigma, Co) y 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ . La mezcla de reacción también contenía 10  $\mu\text{M}$  L-arginina-HCl y 0.2  $\mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-L-arginina (Amersham, aproximadamente 66 Ci/mmol). Los volúmenes finales de reacción fueron ajustados a 100  $\mu\text{L}$  con buffer de homogeneización. Pasado el tiempo de incubación, la reacción fue detenida adicionando 1 mL de una solución amortiguadora de paro (2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH=5.5). La mezcla de reacción (volumen final de 1.1 mL), fue transferida a una columna conteniendo 1 mL de resina Dowex-50W, previamente equilibrada con una solución amortiguadora de paro. La resina de intercambio iónico fue capaz de retener a la L-arginina marcada y permitir que la L-citrulina fluya a través de la columna; posteriormente, a cada eluyente de la mezcla de reacción se le adicionaron 5 mL de líquido de centelleo Aquasol-2 (New England Nuclear) para su cuantificación en un contador de radiactividad. Para determinar la radiactividad de fondo, se prepararon tubos de reacción sin tejido y la radioactividad fue medida, de tal manera que según la técnica, las cuentas por minuto (cpm) de fondo no deben exceder el 4% del total de cuentas adicionadas. Los ng de L-citrulina generada fueron calculados conociendo la actividad específica de la L-arginina marcada (cpm/nmol). Los resultados fueron expresados como ng  $^3\text{H}$ -L-citrulina/500 $\mu\text{g}$  de proteína/30 minutos. Para preparar la columna de intercambio iónico, se tomaron de 100 a 200 g de resina Dowex-50W (Sigma). A ésta se le adicionaron agua desionizada y la mezcla fue agitada. Después, el agua fue removida y la resina lavada con 50-100 mL de NaOH 1N, para convertir la forma ácida de la resina a una sal. El NaOH fue decantado y la resina lavada con agua en abundancia hasta que el sobrenadante alcance un pH inferior a 8. La resina se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  en "stop buffer".

## F) Determinación de expresión de VEGF, KDR, Ki67

Cada muestra fue homogenizada en 250  $\mu$ L de solución final de inhibidores. A partir del homogenizado, se tomó un volumen correspondiente a 50  $\mu$ g de proteína de cada muestra y se mezcló con un volumen igual de buffer de muestra 2X. La desnaturalización de las proteínas se realizó mediante un baño en agua en ebullición durante tres minutos, cada muestra fue depositada en un pozo de un gel de poliacrilamida con SDS al 8 %. La electroforesis se llevó a cabo a 50 mV por 10 minutos y posteriormente a 150 mV durante 50 minutos, después se realizó la transferencia a una membrana de PVDF a 110 mA con el sistema de microtransferencia durante 45 minutos. El bloqueo de proteínas inespecíficas se hizo con una mezcla de leche descremada al 10% disuelta en PBS 1X (0.14 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ , 12.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4)- Tween 0.05%, incubándose en movimiento constante por 1 hora a temperatura ambiente.

La inmunodetección de las proteínas se realizó por separado (utilizando los mismos homogenados que se usarán en la medición anterior) con los anticuerpos primarios VEGF (1:100) y KDR (1:200) (R&D Systems biotechnology), Ki67 (BD biosciences), durante toda la noche. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS – Tween 0.1%. En seguida, se agregó el anticuerpo secundario (peroxidasa anti – ratón 1:3000 y se dejó incubando por otra hora en agitación a temperatura ambiente. Terminando el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con PBS Tween. La detección de las proteínas se hizo con luminol un reactivo que genera quimioluminiscencia (Western Lightning<sup>®</sup> Plus-ECL) y se utilizó una película kodak (X- OMAT).

La positividad fue evaluado de acuerdo al grosor de la banda expresada por 2 investigadores independientes (CP, IP) , revisando la concordancia por un tercer investigador (FPS). Se clasificó: 0= ausente, 1= leve, 2=moderado, 3= severo, 4= muy severo.

## G) Recolección de muestras por inmunohistoquímica

Se obtuvo espécimen histopatológico recolectado en solución preparada con paraformaldehído al 0.4% y PBS 0.2M (Formado por: fosfato de sodio monobásico  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4.816grs, fosfato de sodio dibásico  $\text{Na}_3\text{HPO}_4$  23.56grs. cloruro de sodio  $\text{NaCl}$  0.13grs), cada una de las muestras permaneció en refrigeración a 4°C durante 3 días, posteriormente se sustituyó el fijador con PBS 0.1 M (Formado por: fosfato de sodio monobásico  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  42.408grs, fosfato de sodio dibásico  $\text{Na}_3\text{HPO}_4$  11.78 grs. cloruro de sodio  $\text{NaCl}$  0.696 grs), permaneciendo durante 24 hrs en esta solución, posteriormente se colocó en solución formada por sacarosa al 30% + PBS 0.1M con el fin de crioprotección, enfriándose 24hrs a 4°C, posteriormente a – 20°C. Se realizaron cortes de 30 micras, posteriormente 3 lavados de 10 min cada uno en PBS 0.1 M pH 7.4, incubando una hora en HCl al 1M o 1N a 37 °C, continuando con 3 lavados de 10 min cada uno en PBS, para proceder a bloquear 30 min e incubar en PBS-Tritón (0.3%) + suero normal de caballo 3%, posteriormente se colocaron Anti cuerpo primarios (VEGF, KDR, R&D, Ki67 B&D), se incubaron 2 días a 4 grados centígrados en PBS -

Tritón (0.3%)- suero normal de 3% y anti cuerpo . posteriormente, 3 lavados de 10 min cada uno en PBS, para después incubar con anticuerpo secundario (2 horas en PBS - Tritón (0.3%)- suero normal 3% y anti cuerpo secundario con fluorescencia 1:200 a temperatura ambiente), seguido de 3 lavados de 10 min cada uno en PBS, se montan los cortes en porta objetos, se dejan a temperatura ambiente una hora y se cubren con vectashield con DAPI (marcador fluorescente de núcleos).

La concentración final de VEGF (R&D) fue 1:50, el anticuerpo primario estaba hecho en cabra ; el anticuerpo secundarios fue anti cabra hecho en conejo (1:200) unido a rodamina (rojo), se uso suero normal de conejo. KDR (receptor de VEGF, R&D) se utilizó a una concentración final de 1:200, el anticuerpo primario estaba hecho en ratón; el anticuerpo secundarios fue anti ratón hecho en cabra(1:200) unido a Flurosceina (verde), se uso suero normal de cabra. Ki67 (B&D) se utilizó a una concentración final de 1:50.

#### **H) Evaluación de expresión deVEGF, KDR, Ki67 por inmunohistoquímica:**

VEGF y KDR: cada laminilla fue evaluada por 2 investigadores de forma individual (AGC, SPR), se seleccionaron de cada una de las muestras los 3 campos más representativos, la concordancia fue evaluada por un tercer investigador (VAM). La intensidad de tinción se clasificó: 0: negativo, 1 débil, 3 mediano, 4 severo, y 5 muy severo. El porcentaje de tinción (calculado como el área de tinción positiva en relación al área en su totalidad) se clasificó como: 0= (0%), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) y 4 (>76%).

Ki67: fue calculado de acuerdo al porcentaje de positividad de ki67 en relación con la totalidad de núcleos. Se realizó por investigadores de forma individual (AGC, SPR), revisando la concordancia por un tercer investigador. El conteo se realizó utilizando software ImageJ.

#### **I) Controles:**

Se obtuvieron 4 hipófisis normales obtenidas de autopsia. El tiempo entre la hora de desceso y la obtención de la muestra fue 20 minutos, fueron recolectadas de la misma forma que se refiere a las muestras de inmunohistoquímica y refrigeradas y conservadas bajo las mismas condiciones.

La obtención de hipófisis de autopsia (muerte diferente a patología de hipófisis) estuvo autorizado por el comité de ética de nuestra Institución.

**Control negativo:** se obtuvo muestra de cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cual fue obtenido previo consentimiento de bioética inter-Institucional con el Centro Nacional 20 de noviembre, ISSSTE, con la participación del servicio de cirugía oncológica (JSA). La muestra fue obtenida de un paciente que no había recibido ningún tratamiento previo, se realizó toma guiada por tomografía , analizando la primera muestra por el patólogo de dicha Institución con el objetivo de determinar la positividad al tipo de neoplasia requerida, posterior a dicha confirmación, se obtuvieron 2 muestras más las cuales fueron almacenadas en las condiciones indicadas para inmunohistoquímica y WB.

## CRITERIOS DE SELECCIÓN DE ESTUDIO

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes mayores de 18 años
- Cualquier género
- Diagnóstico de ADH
- Estudios completos pre y postquirúrgicos: IRM, valoración oftalmológica
- Consentimiento informado firmado

### CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Muestra histopatológica insuficiente
- Diagnóstico distinto a adenoma de hipófisis

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Revocación de consentimiento informado

### Tamaño tumoral:

Antes y después de cirugía se realizó protocolo estándar con reconstrucciones coronales, sagitales y axiales, antes y después de la aplicación de medio de contraste (1.5 Teslas Siemens®), fueron clasificados de acuerdo a Hardy, Knosp y volumetría. Para evaluar volumetría se utilizó software OsiriX 10.10®, se realizó cálculo ROI en cortes axiales, coronales y sagitales con gadolinio. Para evaluar el grado de resección se analizó la RMN a los 3 meses, para evitar artefactos.

### Extensión

---

0: ninguna

A: cisterna supraselar

B: receso anterior de 3er ventrículo obliterado

C: piso de 3er ventrículo desplazado

Extensión paraselar:

D: intracraneal (intradural)

E: seno cavernoso (extradural)

### Invasión

- 
- I: silla normal, tumor menor 10mm  
 II: tumor mayor de 10mm  
 III: perforación selar localizada  
 IV: destrucción difusa de piso selar  
 V: extensión vía LCR ó sangre
- 

**Tabla.-** Clasificación de Hardy-Vezina (73)

<b>Clasificación de Knosp (Invasión a seno cavernoso) (74)</b>
<b>Grado 0:</b> el tumor no invade el seno cavernoso. Todas las estructuras anatómicas intracavernosas están preservadas. El tumor no sobrepasa la línea tangencial que une la pared medial de la arteria carótida interna supracavernosa con la carótida interna intracavernosa.
<b>Grado 1:</b> el tumor sobrepasa la tangente medial (definida como la tangente que une los dos bordes mediales de la carótida supra e intracavernosa) pero no sobrepasa la línea tangencial que une los dos centros de la carótida supra e intracavernosa. Los compartimientos venosos superior e inferior pueden estar obstruidos según el crecimiento de la lesión sea en sentido superior o inferior respectivamente.
<b>Grado 2:</b> Se caracteriza porque el tumor se extiende por fuera de la línea intercarotídea, sin sobrepasar la tangente lateral de la carótida intra-supracavernosa.
<b>Grado 3:</b> el tumor se extiende lateralmente a la línea tangencial lateral que une la porción carotídea supracavernosa con la intracavernosa. Los compartimientos venosos medial, superior e inferior suelen estar parcial o completamente obstruidos.
<b>Grado 4:</b> se caracteriza porque la carótida está totalmente englobada por el tumor, estando todos los compartimientos venosos obliterados.

### Evaluación endocrinológica:

Antes y después de cirugía, se realizó perfil hormonal basal. Los ejes hormonales fueron evaluados de la siguiente forma: hipocortisolismo: cortisol sérico basal < 3µg/dl; hipotiroidismo: T4L < 11 pmo/L, hipogonadismo: mujeres: estradiol < 100pmol/L, hombres: testosterona < 10-12 nmol/L, ambos con LH y FSH bajas. Diabetes insípida fue clasificada en el apartado de morbilidad.

## Valoración oftalmológica

Se realizó valoración completa: agudeza visual, campos visuales y fondo de ojo. Se consideró agudeza visual normal 20/20, los campos visuales se evaluaron con perimetría de Goldman. El análisis se realizó al diagnóstico y con la evaluación a los 3, 6 y 12 meses postoperatorios. Se consideró normal si todos los parámetros normalizaron, mejoría: al menos un cuadrante, estable y deterioro.

**Diagnóstico histopatológico:** todos los especímenes correspondieron a adenomas de hipófisis de acuerdo al reporte de neuropatología de nuestra Institución.

**Invasividad:** se utilizaron como criterios Hardy  $\geq$  III y Knosp  $\geq$  III

**Tipo de cirugía:** se clasificó en 3 grupos: transnasal endoscópica (TNE), microscópica transesfenoidal (TSEM) y transcraneal (TC)

### Grado de resección:

- 1.- Biopsia: 1-20%
- 2.- Descompresión: 21-50%
- 3.- Parcial: 51-75%
- 4.- Subtotal: 76-90%
- 5.- Total: >90%

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

El protocolo fue sometido al comité de bioética de INNN siendo aprobado. Se cuenta con consentimiento informado de cada uno de los pacientes incluidos. El protocolo está registrado en con el número 110/12 en el departamento de investigación y comité de bioética de nuestra Institución.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para establecer si existió diferencia significativa entre el volumen tumoral preoperatorio y postoperatorio se utilizó una prueba t de Student.

Para analizar al paciente y sus diversos factores de riesgo se realizó un análisis de regresión logística

Se midió la correlación entre el grado de expresión de los marcadores VEGF, KDR, Ki67 y D2R por inmunohistoquímica y Western Blot, con el tamaño tumoral pre y postoperatorio mediante la correlación de Spearman.

Se realizó prueba de Mann y Whitney y Kruskal Wallis para comparar la expresión de biomarcadores entre 2 ó más grupos.

Para determinar la asociación entre el tipo de cirugía realizada y el porcentaje de resección tumoral se realizó prueba exacta de Fisher.

Se evaluó la expresión de marcadores con antecedente de cirugía previa se con prueba exacta de Fisher.

Se realizó modelo de regresión lineal para establecer los predictores del volumen tumoral postoperatorio.

El efecto de cada variable se determinó con OR con un IC 95%, calculado para cada una.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 21. Se tomó como significativo un resultado de  $\alpha$  menor a 0.05.

## RESULTADOS

Durante el periodo mencionado se obtuvieron 89 muestras, se realizó eliminación de 26 muestras, 20 por diagnóstico distinto a adenoma de hipófisis, 6 por muestra insuficiente.

**Población:** 63 pacientes fueron incluidos: masculino 32/63 (50.8%), femenino 31/63 (49.2%).

La edad promedio al diagnóstico fue 46.77 años (19-72).

### Presentación clínica

Las presentaciones clínicas más frecuentes fueron: alteraciones visuales 52/63 (82.5%) y cefalea 39/63 (61.9%).

Síntoma de presentación	Casos
Alteraciones visuales	52/63 (82.5%)
Crecimiento acral	8/63 (12.7%)
Crisis convulsivas	5/63 (7.9%)
Amenorrea	3/63 (4.8%)
Déficit de nervios craneales	2/63 (3.2%)
Apoplejía	1/63 (1.6%)
Amenorrea-galactorrea	1/63 (1.6%)
Hidrocefalia	1/63 (1.6%)

**Tabla 5.- Presentaciones clínicas al diagnóstico**

## ALTERACIONES VISUALES

Se encontró alteraciones visuales en 52/63 (82.5%), siendo la más frecuente hemianopsia bitemporal 36/52 (69.23%). Se resumen las diversas alteraciones encontradas en tabla 6.



<b>Tipo de afección visual</b>	<b>Casos</b>
Hemianopsia bitemporal	36/52 (69.23%)
HBT unilateral + amaurosis contralateral	6/52 (11.53%)
Amaurosis unilateral	3/52 (5.76%)
Amaurosis bilateral	3/52 (5.76%)
Hemianopsia homónima	1/52 (1.9%)
Cuadrantanopsia unilateral	1/52 (1.9%)
Visión cuenta dedos bilateral	1/52 (1.9%)
Amaurosis unilateral + cuadrantanopsia contralateral	1/52 (1.9%)

**Tabla 6.-** Alteraciones visuales al diagnóstico

A los 3 meses de la cirugía se encontró mejoría en 36/52 (69.23%), visión normal 10/52 (19.23%), sin mejoría 5/52 (9.61%), deterioro 1/52 (1.92%).

El caso de deterioro fue debido a aracnoidocele selar con compresión del quiasma óptico, fue tratado exitosamente con quiasmopexia. Los casos que no presentaron mejoría fue en aquellos pacientes que presentaron amaurosis de larga evolución, con atrofia óptica previa. No existió mayor grado de mejoría a los 6 y 12 meses postoperatorios ( $p=0.92$ ), ni relacionado a ninguna técnica quirúrgica  $p=0.84$

## **EVALUACIÓN HORMONAL**

La definición de alteraciones de ejes hormonales se realizó de acuerdo a los parámetros descritos en la sección de métodos.

El principal eje afectado fue el gonadal 36/63 (57.1%), seguido del tiroideo 16/63 (25.4%) y por último el adrenal 7/63 (11.1%). El número de ejes hormonales afectados por paciente se resume en tabla 7.

<b>Ejes afectados al diagnóstico</b>	<b>Casos</b>
1	29/63 (46%)
2	12/63 (19%)
3	10/63 (15.87%)

**Tabla 7.-** Alteración de ejes hormonales

Un año posterior a cirugía se encontró hipogonadismo 21/63 (33%), hipotiroidismo 22/63 (34.9%), hipocortisolismo 14/63 (22.2%)

## **CIRUGÍA PREVIA**

Trece pacientes (20.6%) tuvieron el antecedente de cirugía previa; 7/13 (53.84%) 2 cirugías previas, 5/13 (38.46%) 1 cirugía previa, 1/13 (7.69%) 3 cirugías previas.

## TIPO DE CIRUGÍA

Transnasal endoscópica (TNE) 42/63 (66.7%), microscópica transesfenoidal (TSEM) 17/63 (27%), transcraneal 4/63 (6.3%).

## COMPLICACIONES

La principal causa de morbilidad fue diabetes insípida (DI) encontrándose en 23/63 (36.5%), fue dividida en transitoria 17/23 (73.9%) y permanente 6/23 (26%). Otras complicaciones encontradas fueron: infarto 1/63 (1.6%), fístula de líquido cefalorraquídeo (LCR) + infección 1/63 (1.6%), reintervención inmediata por hematoma del lecho quirúrgico 1/63 (1.6%). Se encontró un caso de mortalidad, el cual corresponde al paciente que presentó infarto masivo a las 96 hrs postoperatorias.

Comparando el tipo de cirugía (TNE, TSEM, TC), el abordaje endonasal endoscópico se asoció a mayor presentación de DI ( $p=0.027$ )

## ESTANCIA HOSPITALARIA

Tipo de cirugía	Días de estancia (promedio)
TNE	5
TSEM	7
TC	9

**Tabla 8.-** Días de hospitalización por tipo de cirugía

El abordaje endonasal endoscópico se asoció a menos días de estancia hospitalaria ( $p=0.049$ ).

## TIPO DE TUMOR

El tipo de tumor más frecuente en esta muestra fueron los adenomas no funcionales constituyendo 74.6%. Los adenomas funcionales representaron 25.4%. Tabla 9

Tipo de adenoma	Número
AHNF	47/63 (74.6%)
Productor de GH	12/63 (19%)
Productor de ACTH	3/63 (4.8%)
Productor de PRL y GH	1/63 (1.6%)

**Tabla 9.-**

## TAMAÑO TUMORAL

Al momento de la cirugía el promedio de volumen preoperatorio fue 14.14 cm<sup>3</sup> (DE +- 11.17), el promedio de volumen postoperatorio fue 4.54 cm<sup>3</sup> (DE +- 5.63). La diferencia en el volumen tumoral pre y postoperatorio fue estadísticamente significativa ( $t_{(62)}=9.14$ ;  $p=0.0000$ ), siendo independiente de si existió cirugía previa ( $t_{(12)}=3.07$ ;  $p=0.005$ ) o no ( $t_{(49)}=8.77$ ;  $p=0.0000$ ). Todos fueron macroadenomas. De acuerdo a Hardy: II: 10/63 (15.9%), III 35/63 (55.6%), IV 18/63 (28.6%); de acuerdo a Vezina: B: 5/63 (7.93%), C 9/63 (14.28%), D: 15/63 (45.45%) E: 34/63 (54%). Se encontró invasión a seno cavernoso en 34/63 (54%). Adenomas gigantes: 34/63 (54%).

## PORCENTAJE DE RESECCIÓN

Los datos se resumen en tabla 10. No encontramos diferencia en porcentaje de resección y tipo de cirugía (TSE, TNE, TC)  $P= 0.729$ . Tampoco existió diferencias al comparar únicamente los abordajes endoscópico y microscópico  $p= 0.86$ .

Grados de resección	Número
Biopsia (1-20%)	3/63 (4.8%)
Descompresión (21-50%)	12/63 (19%)
Resección parcial (51-75%)	18/63 (28.6%)
Resección subtotal (76-90%)	14/63 (22.2%)
Total (>91%)	16/63 (25.4%)

Tabla 10.-

## EXPRESIÓN DE VEGF Y KDR EN AUTOPSIAS DE HIPÓFISIS NORMAL

	% VEGF	Intensidad VEGF	% KDR	Intensidad KDR
H1	9.97 (grupo 1)	Débil	10.3 (grupo 1)	Débil
H2	11 (grupo 1)	Débil	19.33 (grupo 1)	Débil
H3	6.83 (grupo 1)	Débil	11.66 (grupo 1)	Débil
H4	24.3 (grupo 2)	Débil	22.5 (grupo 2)	Débil

En todas las hipófisis normales, obtenidas de autopsia encontramos menor expresión de VEGF y KDR comparado con las muestras tumorales de adenomas de hipófisis

## EXPRESIÓN DE MARCADORES TUMORALES

Se anexa tabla con resultados globales.

Subtipo de adenoma	VEGF: porcentaje de expresión	VEGF: Intensidad	WB VEGF	Banda	KDR porcentaje de expresión	KDR: Intensidad	KDR WB
ADHNF	43%	+	Positivo	1	65%	Severa	Positivo
ADHNF	31%	++	Positivo	3	40%	++	Positivo
ADHNF	16%	+	Positivo	2	18%	+	Positivo
ADHNF	23%	+	Positivo	1	42%	++	Positivo
ADHNF	14%	+	Positivo	1	23%	+	Positivo
ADHNF	6%	+	Positivo	1	14%	+	Positivo
ADHNF	3%	+	Positivo	1	9%	+	Positivo
ADHNF	25%	+	Positivo	1	34%	++	Positivo
ADHNF	7%	+	Positivo	1	15%	+	Positivo
ADHNF	24%	+	Positivo	1	28%	++	Positivo
ADHNF	13%	+	Positivo	1	22%	+	Positivo
ADHNF	13%	+	Positivo	1	20%	+	Positivo
ADHNF	43%	++	Positivo	1	73%	+++	Positivo
ADHNF	23%	++	Positivo	2	33%	++	Positivo
ADHNF	29%	++	Positivo	3	46%	++	Positivo
ADHNF	SD	SD	Negativo	0	SD	SD	Negativo
ADHNF	27%	++	Positivo	1	46%	++	Positivo
ADHNF	11%	+	Positivo	2	15%	+	Positivo
ADHNF	24%	++	Positivo	2	22%	++	Positivo
ADHNF	18%	+	Positivo	1	29%	++	Positivo
ADHNF	22%	+	Positivo	1	29%	++	Positivo
ADHNF	36%	++	Positivo	2	57%	+++	Positivo
ADHNF	17%	+	Positivo	2	24%	+	Positivo
ADHNF	18%	+	Positivo	2	30%	++	Positivo
ADHNF	25%	++	Positivo	2	38%	++	Positivo
ADHNF	35%	++	Positivo	1	40%	++	Positivo
ADHNF	10%	+	Positivo	2	15%	+	Positivo
ADHNF	15%	+	Positivo	1	23%	+	Positivo
ADHNF	28%	++	Positivo	2	22%	++	Positivo
ADHNF	7%	+	Positivo	1	15%	+	Positivo
ADHNF	23%	+	Positivo	2	43%	++	Positivo
ADHNF	27%	++	Positivo	2	38%	++	Positivo
ADHNF	21%	+	Positivo	2	40%	++	Positivo
ADHNF	25%	+	Positivo	2	32%	++	Positivo
ADHNF	16%	+	Positivo	1	43%	++	Positivo
ADHNF	27%	++	Positivo	1	49%	++	Positivo
ADHNF	22%	+	Positivo	1	97%	++++	Positivo
ADHNF	31%	++	Positivo	2	SD	SD	SD
ADHNF	12%	+	Positivo	3	31%	++	Positivo
ADHNF	22%	+	Positivo	1	33%	++	Positivo
ADHNF	4%	+	Positivo	2	9%	+	Positivo
ADHNF	SD	SD	Negativo	0	SD	SD	Negativo

ADHNF	14%	+	Positivo	3	12%	+	Positivo
ADHNF	21%	+	Positivo	2	31%	++	Positivo
ADHNF	18%	+	Positivo	2	22%	+	Positivo
ADHNF	SD	SD	Negativo	0	19%	+	Positivo
GH	SD	SD	Negativo	0	SD	SD	Negativo
GH	24%	+	Positivo	1	38%	++	Positivo
GH	45%	++	Positivo	2	61%	Severo	Positivo
GH	SD	SD	Negativo	0	SD	SD	Negativo
GH	25%	++	Positivo	2	45%	++	Positivo
GH	SD	SD	Negativo	0	SD	SD	Negativo
GH	SD	SD	Negativo	0	SD	SD	Negativo
GH	18%	+	Positivo	1	35%	++	Positivo
GH	16%	++	Positivo	2	26%	++	Positivo
GH	17%	+	Positivo	1	27%	++	Positivo
GH	12%	+	Positivo	1	19%	+	Positivo
GH	SD	SD	Negativo	0	SD	SD	Negativo
GH/PRL	9%	+	Positivo	1	34%	++	Positivo
ACTH	48%	+++	Positivo	3	SD	SD	SD
ACTH	56%	+++	Positivo	4	SD	SD	SD
ACTH	17%	+	Positivo	2	33	++	Positivo
ACTH	9%	+	Positivo	1	36	++	Positivo

**Tabla 11.-**

Por inmunohistoquímica se encontró positividad en todas las muestras a VEGF, KDR y Ki67, lo cual fue corroborado con WB.

Se evaluó el grado de expresión de VEGF, KDR y Ki67 entre adenomas funcionales y no funcionales, ninguno de los marcadores mostró asociación con un subtipo específico de adenoma.

(VEGF: inmunohistoquímica (p=0.826); intensidad de banda (p=0.256) WB (p=0.305); KDR ( WB p=0.80) ( Inmunohistoquímica p=0.13).

No existió asociación en la expresión de Ki67 >3% comparando el grupo de adenomas de hipófisis no funcionales con adenomas funcionales (p=0.86).

Se evaluó la expresión de ki67 >3% en los diferentes grupos de tumores funcionales (ACTH, GH, Mixto) sin existir diferencias en expresión (p=0.33).

### **Volumen preoperatorio y expresión de VEGF y KDR**

No se encontró asociación entre el volumen preoperatorio y porcentaje de expresión VEGF {inmunohistoquímica (P=0.80), tampoco se encontró asociación con intensidad de tinción (p=0.91); WB: (p=0.61)

El porcentaje e intensidad de KDR no se asoció al volumen preoperatorio (p=0.29)

### **Volumen preoperatorio y Ki67**

Se encontró una asociación entre la expresión de Ki67 mayor de 3% con mayor volumen preoperatorio (p=0.04). No existieron diferencias de acuerdo al tipo de tumor (p=0.85)

### **Adenomas gigantes**

No se encontró asociación con expresión de VEGF, KDR y adenomas gigantes ( VEGF: WB  $P=0.77$ , inmunohistoquímica intensidad  $p=0.735$ , porcentaje de tinción  $p=0.3$ ) (KDR y adenomas gigantes (WB  $p=0.73$ , inmunohistoquímica porcentaje e intensidad  $p=0.73$ )

No existió asociación con Ki67  $>3\%$  con adenomas gigantes ( $p=0.915$ )

### **Asociación de expresión de marcadores**

De acuerdo al análisis de correlación de Spearman se encontró correlación entre el porcentaje de expresión de KDR y VEGF ( $p=0.0469$ ),

### **Asociación de expresión de VEGF, KDR y Ki67 con características clínicas**

De 63 casos incluidos, 32 hombres, 31 mujeres, fueron definidos como adenomas invasores 34/63 (54%) de acuerdo a la clasificación de Knosp de invasión a seno cavernoso. No se encontró asociación con invasión a seno cavernoso y expresión de VEGF (WB  $p=0.606$ ; inmunohistoquímica intensidad de tinción  $p=0.824$ , inmunohistoquímica porcentaje  $p=0.655$ ).

No se encontró asociación con expresión de KDR e invasión a seno cavernoso (WB e inmunohistoquímica,  $p=0.713$ )

No se encontró asociación con expresión de Ki67  $>3\%$  e invasión a seno cavernoso ( $p=0.678$ ).

No se encontró asociación entre expresión de VEGF y género [WB: ( $p=0.34$ ), inmunohistoquímica: intensidad de tinción ( $p=0.53$ ), género y porcentaje ( $p=0.72$ )].

Se encontró una asociación con mayor intensidad de KDR en el género femenino ( $p=0.0176$ ).

No se encontró asociación con edad y expresión de VEGF y KDR [ $P=0.09$ ,  $P=0.76$ ; respectivamente). No encontramos diferencias en la expresión de VEGF, KDR y Ki67 en los pacientes con antecedente de cirugía previa ( $p=0.54$ )

## DISCUSIÓN

En 1972, Judah Folkman (85) fue el primero en demostrar la necesidad de angiogénesis para el crecimiento y diseminación de tumores sólidos. Sin embargo, en ese mismo año, Schechter et al. (86) reporta menor vascularidad en tumores de hipófisis comparados con la glándula normal. Desde entonces se han realizado varios estudios con la finalidad de cuantificar el sistema microvascular de la hipófisis normal y patológica, sin embargo los resultados han sido ampliamente discordantes.

VEGF es el principal mediador de proliferación endotelial, angiogénesis y permeabilidad vascular. Tiene un papel crucial en la génesis y progresión de tumores sólidos (60, 61, 62, 63). Onofri et al, analizaron la expresión de VEGF en 39 ADH, resultando negativos sólo 5 casos (13%) (87). Lloyd et al (37), en 148 muestras de ADH, evaluaron la expresión de VEGF por inmunohistoquímica, demostrando positividad en todos los grupos, con mayor intensidad de tinción en ADHNF, productores de HC y ACTH, no reportan diferencias en positividad en carcinomas, posterior a tratamiento con ocreótido se encontró menor expresión de VEGF (37). McCabe et al (67), realizan un estudio evaluando la expresión de VEGF, KDR y PTTG mediante PCR en 121 pacientes, encontrando mayor positividad en ADHN (67). Niveiro et al (68), realizan un estudio por inmunohistoquímica evaluando VEGF, KDR, Ki67, y densidad microvascular (DMV, mediante CD34), encontrando una mayor expresión de VEGF en ADHNF y en pacientes de mayor edad, reportan también un fenotipo más agresivo asociado a mayor expresión de KDR ( $P < 0.005$ ). Pérez-Millán et al, (71), realizan otro estudio evaluando la presencia de cambios morfológicos en la vasculatura de ADH y correlacionando con la expresión de Ki67, por DMV encuentran la presencia de mayor cantidad de vasos sanguíneos en ADH, pero de menor calibre, no se encuentra correlación con el nivel de expresión de Ki67 y marcadores angiogénicos (71). Sánchez-Ortiga et al (65), realizan un estudio en 46 ADH evaluando la expresión de VEGF y KDR, encuentran una mayor expresión en ADHNF ( $p = 0.036$ ), encontrando asociación con el tamaño tumoral medido por resonancia magnética y extensión supraselar ( $p = 0.007$ ), reportan un riesgo incrementado de 27.5 veces respecto a crecimiento extraselar si la expresión de VEGF excede a 0.22 NCN ( $p = 0.002$ ), aquellos tumores con KDR mayor de 0.750 NCN se asociaron a un menor periodo libre de recurrencia ( $p = 0.032$ ) (65). Wang et al (72), en un estudio con inmunohistoquímica y WB en 197 adenomas de hipófisis, encuentran positividad a VEGF en 96.44%, encontrándose una alta expresión en PRL, ACTH y ADHNF. En nuestro estudio encontramos menor expresión de VEGF y KDR en hipófisis normales, comparado con adenomas de hipófisis, Todos los adenomas incluidos ( $n=63$ ) fueron positivos a VEGF, KDR y ki67. Se encontró correlación entre el porcentaje de expresión de KDR y VEGF ( $p=0.0469$ ). Se encontró una asociación positiva entre la expresión de Ki67 mayor de 3% con mayor volumen preoperatorio ( $p=0.04$ ), sin existir diferencias de acuerdo al tipo de tumor ( $p=0.85$ ). Se encontró una asociación positiva de expresión de KDR en el género femenino ( $p= 0.0176$ ), sin existir diferencias respecto a edad.

No encontramos diferencias en grado de expresión relacionado con los diferentes subtipos de adenomas, esto podría explicarse por las diferencias en grupos (ADHNF: 47, ADHF: 16). No se encontró asociación con el volumen preoperatorio y expresión de VEGF y KDR. No encontramos asociación con expresión de VEGF, KDR y Ki67 e invasión a seno cavernoso.

Realizando un análisis extenso de la literatura respecto al papel de la angiogénesis en la patogénesis de adenomas de hipófisis los resultados continúan siendo discordantes. Es de resaltar que en nuestra población el tamaño tumoral es considerablemente mayor respecto a los estudios existentes y sería interesante plantear estudios con mayor seguimiento.

### **CONCLUSIONES:**

Los mecanismos que involucran la angiogénesis, y primordialmente VEGF en la génesis y progresión de adenomas de hipófisis aún no es claro. Se requieren más estudios para investigar los efectos de terapia anti-VEGF en pacientes con adenomas de hipófisis. La angioarquitectura tumoral puede ser un potencial biomarcador, principalmente pronóstico y terapéutico para determinados tumores. Se requieren estudios a largo plazo y con mayor número de pacientes para esclarecer estas discordancias.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. Annual review of pathology. 2009;4:97-126.
- 2.- Aflorei ED, Korbonits M. Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas. Journal of neuro-oncology. 2014;117(3):379-94.
- 3.- Kovacs K, Horvath E, Vidal S. Classification of pituitary adenomas. Journal of neuro-oncology. 2001;54(2):121-7.
- 4.- Scheithauer BW, Kovacs KT, Laws ER, Jr., Randall RV. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. Journal of neurosurgery. 1986;65(6):733-44.
- 5.- Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, Stefaneanu L, Horvath E, Pernicone PJ, et al. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. Neurosurgery. 1996;38(1):99-106; discussion -7.
- 6.- Meij BP, Lopes MB, Ellegala DB, Alden TD, Laws ER, Jr. The long-term significance of microscopic dural invasion in 354 patients with pituitary adenomas treated with transsphenoidal surgery. Journal of neurosurgery. 2002;96(2):195-208.
- 7.- Kaltsas GA, Nomikos P, Kontogeorgos G, Buchfelder M, Grossman AB. Clinical review: Diagnosis and management of pituitary carcinomas. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2005;90(5):3089-99.
- 8.- Buchfelder M. Management of aggressive pituitary adenomas: current treatment strategies. Pituitary. 2009;12(3):256-60.
- 9.- McCormack AI, Wass JA, Grossman AB. Aggressive pituitary tumours: the role of temozolomide and the assessment of MGMT status. European journal of clinical investigation. 2011;41(10):1133-48.
- 10.- Raverot G, Castinetti F, Jouanneau E, Morange I, Figarella-Branger D, Dufour H, et al. Pituitary carcinomas and aggressive pituitary tumours: merits and pitfalls of temozolomide treatment. Clinical endocrinology. 2012;76(6):769-75.
- 11.- Kovacs K, Horvath E, Vidal S. Classification of pituitary adenomas. Journal of neuro-oncology. 2001;54(2):121-7.
- 12.- Sanno N, Teramoto A, Osamura RY, Horvath E, Kovacs K, Lloyd RV, et al. Pathology of pituitary tumors. Neurosurgery clinics of North America. 2003;14(1):25-39.
- 13.- Horvath E, Kovacs K. The adenohipophysis. In: Kovacs K, Asa SL, editors.

Functional endocrine pathology. Boston: Blackwell; 1991. p. 245–81.

14.- Al-Shraim M, Asa SL. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: what is new? *Acta neuropathologica*. 2006;111(1):1-7.

15.- Colao A. Treatment of pituitary tumours in 2014: Advances in therapy of adenomas secreting GH, ACTH and TSH. *Nature reviews Endocrinology*. 2014.

16.- Murad MH, Fernandez-Balsells MM, Barwise A, Gallegos-Orozco JF, Paul A, Lane MA, et al. Outcomes of surgical treatment for nonfunctioning pituitary adenomas: a systematic review and meta-analysis. *Clinical endocrinology*. 2010;73(6):777-91.

17.- Jaffe CA. Clinically non-functioning pituitary adenoma. *Pituitary*. 2006;9(4):317-21.

18.- Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, Barr CE, Dodge WE, Vance ML, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004;101(3):613-9.

19.- Zada G, Woodmansee WW, Ramkissoon S, Amadio J, Nose V, Laws ER, Jr. Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. *Journal of neurosurgery*. 2011;114(2):336-44.

20.- Hayashi M, Izawa M, Hiyama H, Nakamura S, Atsuchi S, Sato H, et al. Gamma Knife radiosurgery for pituitary adenomas. *Stereotactic and functional neurosurgery*. 1999;72 Suppl 1:111-8.

21.- Minniti G, Traish D, Ashley S, Gonsalves A, Brada M. Fractionated stereotactic conformal radiotherapy for secreting and nonsecreting pituitary adenomas. *Clinical endocrinology*. 2006;64(5):542-8.

22.- Iwai Y, Amanakak Y, Oshioka K: Radiosurgery for nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery* 56:699–705, 2005

23.- Losa M, Valle M, Mortini P, Franzin A, da Passano C, Cenzato M, et al: Gamma knife surgery for the treatment of residual nonfunctioning pituitary adenomas after surgical debulking. *J Neurosurg* 100:438–444, 2004

24.- Petrovitch Z, Yu C, Giannotta SL, Zee CS, Apuzzo ML: Gamma knife radiosurgery for pituitary adenoma: early results. *Neurosurgery* 53:51–59, 2003

25.- Pollock BE, Carpenter PC: Stereotactic radiosurgery as an alternation to fractionated radiotherapy for patients with recurrent or residual nonfunctioning pituitary adenomas. *Neurosurgery* 53: 1086–1094, 2003

26.- Wowra B, Strummer W: Efficacy of gamma knife radiosurgery for nonfunctioning pituitary adenomas: a quantitative follow-up with magnetic resonance imaging-based volumetric analysis. *J Neurosurg* 97 (5 Suppl):429–443, 2002

- 27.- Coke C, Andrews DW, Corn BW, Werner-Wasik M, Downes B, McCune C, et al: Multiple fractionated stereotactic radiotherapy of residual pituitary macroadenomas: initial experience. *Stereotact Funct Neurosurg* 69:183–190, 1997
- 28.- Colin P, Jovenin N, Delemer B, Caron J, Grulet H, Hecart AC, et al: Treatment of pituitary adenomas by fractionated stereotactic radiotherapy: a prospective study of 110 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:333–341, 2005
- 29- Milker-Zabel S, Debus J, Thilmann C, Schlegel W, Wannemacher M: Fractionated stereotactically guided radiotherapy and radiosurgery in the treatment of functional and non- functional adenomas of the pituitary gland. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50:1279–1286, 2001
- 30.- Minniti G, Traish D, Ashley S, Gonsalves A, Brada M: Fractionated stereotactic conformal radiotherapy for secreting and nonsecreting pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:542–548, 2005
31. Mitsumori M, Shrieve DC, Alexander E III, Kaiser UB, Richardson GE, Black PM, et al: Initial clinical results of LINAC- based stereotactic radiosurgery and stereotactic radiotherapy for pituitary adenomas. *Int J Radiat Oncol Biol Physics* 42:573–580, 1998
- 32.- Paek SH, Downes MB, Bednarz G, Keane WM, Werner-Wasik M, Curran WJ Jr, et al: Integration of surgery with fractionated stereotactic radiotherapy for treatment of nonfunctioning pituitary macroadenomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61: 795–808, 2005
33. Pamir MN, Kilic T, Belirgen M, Abacioglu U, Karabekiroglu N: Pituitary adenomas treated with gamma knife radiosurgery: volumetric analysis of 100 cases with minimum 3 year follow- up. *Neurosurgery* 61:270–280, 2007
- 34.- Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. Aggressive pituitary adenomas--diagnosis and emerging treatments. *Nature reviews Endocrinology*. 2014;10(7):423-35.
- 35.- Pivonello R, Ferone D, de Herder WW, de Krijger RR, Waaijers M, Mooij DM, et al. Dopamine receptor expression and function in human normal adrenal gland and adrenal tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(9):4493-502.
- 36.- Gagliano T, Filieri C, Minoia M, Buratto M, Tagliati F, Ambrosio MR, et al. Cabergoline reduces cell viability in non functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion. *Pituitary*. 2013;16(1):91-100.
- 37.- Lloyd R, Scheithauer BW, Kuroki T, Vidal S, Kovacs K, Stefaneanu L; Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Pituitary

Adenomas and Carcinomas; *Endocrine Pathology* Volume 10, Number 3, Fall 1999

38.- Ortiz LD, Syro LV, Scheithauer BW, Ersen A, Uribe H, Fadul CE, et al. Anti-VEGF therapy in pituitary carcinoma. *Pituitary*. 2012;15(3):445-9.

39.- Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Buchfelder M, Fahlbusch R, Lancranjan L. Dopamine D2 receptor gene expression in human adenohypophysial adenomas. *Endocrine*. 2001;14(3):329-36.

40.- Pascal-Vigneron V, Weryha G, Bosc M, Leclere J. [Hyperprolactinemic amenorrhea:treatment with cabergoline versus bromocriptine. Results of a national multicenter randomized double-blind study]. *Presse medicale*. 1995;24(16):753-7.

41.- Verhelst J, Abs R, Maiter D, van den Bruel A, Vandeweghe M, Velkeniers B, et al. Cabergoline in the treatment of hyperprolactinemia: a study in 455 patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(7):2518-22.

42.- Cuny T, Barlier A, Feelders R, Weryha G, Hofland LJ, Ferone D, et al. Medical therapies in pituitary adenomas: Current rationale for the use and future perspectives. *Annales d'endocrinologie*. 2014.

43.- Starke RM, Raper DM, Payne SC, Vance ML, Oldfield EH, Jane JA, Jr. 24.- Endoscopic vs microsurgical transsphenoidal surgery for acromegaly: outcomes in a concurrent series of patients using modern criteria for remission. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(8):3190-8.

44.- Jaquet P, Saveanu A, Gunz G, Fina F, Zamora AJ, Grino M, et al. Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(2):781-92.

45.- Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *European journal of nuclear medicine*. 2001;28(7):836-46.

46.- Carmichael JD, Bonert VS, Nuno M, Ly D, Melmed S. Acromegaly clinical trial methodology impact on reported biochemical efficacy rates of somatostatin receptor ligand treatments: a meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(5):1825-33.

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

- 48.- Colao A, Bronstein MD, Freda P, Gu F, Shen CC, Gadelha M, et al. Pasireotide versus octreotide in acromegaly: a head-to-head superiority study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(3):791-9.
- 49.- Giustina A, Chanson P, Kleinberg D, Bronstein MD, Clemmons DR, Klibanski A, et al. Expert consensus document: A consensus on the medical treatment of acromegaly. *Nature reviews Endocrinology*. 2014;10(4):243-8.
- 50.- Sandret L, Maison P, Chanson P. Place of cabergoline in acromegaly: a meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(5):1327-35.
- 51.- Buhk JH, Jung S, Psychogios MN, Goricke S, Hartz S, Schulz-Heise S, et al. Tumor volume of growth hormone-secreting pituitary adenomas during treatment with pegvisomant: a prospective multicenter study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(2):552-8.
- 52.- Biller BM, Grossman AB, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J, et al. Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(7):2454-62.
- 53.- Feelders RA, Hofland LJ. Medical treatment of Cushing's disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(2):425-38.
- 54.- Cavallo LM, Solari D, Tasiou A, Esposito F, de Angelis M, D'Enza AI, et al. Endoscopic endonasal transsphenoidal removal of recurrent and regrowing pituitary adenomas: experience on a 59-patient series. *World neurosurgery*. 2013;80(3-4):342-50.
- 55.- Zada G, Woodmansee WW, Ramkissoon S, Amadio J, Nose V, Laws ER, Jr. Atypical pituitary adenomas: incidence, clinical characteristics, and implications. *Journal of neurosurgery*. 2011;114(2):336-44.
- 56.- Mete O, Ezzat S, Asa SL. Biomarkers of aggressive pituitary adenomas. *Journal of molecular endocrinology*. 2012;49(2):R69-78.
- 57.- Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV, Cusimano M. Biomarkers of pituitary neoplasms: a review (Part II). *Neurosurgery*. 2010;67(6):1790-8; discussion 8.
- 58.- Prevedello DM, Jagannathan J, Jane JA, Jr., Lopes MB, Laws ER, Jr. Relevance of high Ki-67 in pituitary adenomas. Case report and review of the literature. *Neurosurgical focus*. 2005;19(5):E11.
- 59.- Gao H, Wang Q, Wu S, Hui G. Examination of the relationship between chromosome abnormality in pituitary adenomas and tumor invasiveness by normal karyotype analysis and interphase fluorescence staining. *Medical*

oncology. 2012;29(5):3462-6.

60.- Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocrine reviews*. 2003;24(5):600-32.

61.- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.

62.- Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL, Wass JA. Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(3):1159-62.

63.- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent progress in hormone research*. 2000;55:15-35; discussion -6.

64.- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.

65.- Sanchez-Ortiga R, Sanchez-Tejada L, Moreno-Perez O, Riesgo P, Niveiro M, Pico Alfonso AM. Over-expression of vascular endothelial growth factor in pituitary adenomas is associated with extrasellar growth and recurrence. *Pituitary*. 2013;16(3):370-7.

66.- Raica M, Coculescu M, Cimpean AM, Ribatti D. Endocrine gland derived-VEGF is down-regulated in human pituitary adenoma. *Anticancer research*. 2010;30(10):3981-6.

67.- McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(9):4238-44.

68.- Niveiro M, Aranda FI, Peiro G, Alenda C, Pico A. Immunohistochemical analysis of tumor angiogenic factors in human pituitary adenomas. *Human pathology*. 2005;36(10):1090-5

69.- Pan LX, Chen ZP, Liu YS, Zhao JH. Magnetic resonance imaging and biological markers in pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space. *Journal of neuro-oncology*. 2005;74(1):71-6.

70.- Iuchi T, Saeki N, Osato K, Yamaura A. Proliferation, vascular endothelial growth factor expression and cavernous sinus invasion in growth hormone secreting pituitary adenomas. *Acta neurochirurgica*. 2000;142(12):1345-51.

71.- Cristina C, Perez-Millan MI, Luque G, Dulce RA, Sevlever G, Berner SI, et al. VEGF and CD31 association in pituitary adenomas. *Endocrine pathology*. 2010;21(3):154-60.

72.- Wang Y, Li J, Tohti M, Hu Y, Wang S, Li W, et al. The expression profile of Dopamine D2 receptor, MGMT and VEGF in different histological subtypes of

pituitary adenomas: a study of 197 cases and indications for the medical therapy. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR. 2014;33:56.

73.- Hardy J. Transphenoidal microsurgery of the normal and pathological pituitary. *Clinical neurosurgery*. 1969;16:185-217.

74.- Knosp E, Steiner E, Kitz K, Matula C. Pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space: a magnetic resonance imaging classification compared with surgical findings. *Neurosurgery*. 1993;33(4):610-7; discussion 7-8.

75.- Lloyd, R. V. *et al.* in *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs* (eds DeLellis, R. A. *et al.*) 10–13 (IARC Press, 2004).

76.- Delgrange E, Trouillas J, Maiter D, Donckier J, Tourniaire J. Sex-related difference in the growth of prolactinomas: a clinical and proliferation marker study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(7):2102-7.

77.- Heaney AP. Clinical review: Pituitary carcinoma: difficult diagnosis and treatment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(12):3649-60.

78.- Delgrange E, Sassolas G, Perrin G, Jan M, Trouillas J. Clinical and histological correlations in prolactinomas, with special reference to bromocriptine resistance. *Acta neurochirurgica*. 2005;147(7):751-7; discussion 7-8.

79.- Saeger W, Ludecke DK, Buchfelder M, Fahlbusch R, Quabbe HJ, Petersenn S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2007;156(2):203-16.

80.- George DH, Scheithauer BW, Kovacs K, Horvath E, Young WF, Jr., Lloyd RV, *et al.* Crooke's cell adenoma of the pituitary: an aggressive variant of corticotroph adenoma. *The American journal of surgical pathology*. 2003;27(10):1330-6.

81.- Jahangiri A, Wagner JR, Pekmezci M, Hiniker A, Chang EF, Kunwar S, *et al.* A Comprehensive Long-Term Retrospective Analysis of Silent Corticotrophic Adenomas versus Hormone-Negative Adenomas. *Neurosurgery*. 2013.

82.- Mete O, Asa SL. Clinicopathological correlations in pituitary adenomas. *Brain pathology*. 2012;22(4):443-53.

83.- Mete O, Asa SL. Therapeutic implications of accurate classification of pituitary adenomas. *Seminars in diagnostic pathology*. 2013;30(3):158-64.

84.- Batisse M, Raverot G, Maqdasy S, Durando X, Sturm N, Montoriol PF, et al. Aggressive silent GH pituitary tumor resistant to multiple treatments, including temozolomide. *Cancer investigation*. 2013;31(3):190-6.

85.- Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Annals of surgery*. 1972;175(3):409-16.

86.- Schechter J. Ultrastructural changes in the capillary bed of human pituitary tumors. *The American journal of pathology*. 1972;67(1):109-26.

87.- Onofri C, Theodoropoulou M, Losa M, Uhl E, Lange M, Arzt E, et al. Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in normal and adenomatous pituitaries: detection of a non-endothelial function of VEGF in pituitary tumours. *The Journal of endocrinology*. 2006;191(1):249-61.



14) APÉNDICE 1: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**APÉNDICE 1:  
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE  
INVESTIGACIÓN MÉDICA**

**Título del protocolo: “Factor de crecimiento endotelial vascular como predictor de recurrencia en adenomas hipofisarios no funcionales”**

**Investigador principal:** Sara Patricia Pérez Reyes

**Sede donde se realizará el estudio:** Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

**Nombre del paciente:**

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados.

Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

- 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO** *(Se le explica de manera verbal y por escrito al paciente y familiar, de manera entendible, aclarando todo tipo de dudas antes de la firma del consentimiento)*

Los adenomas de hipófisis no funcionales representan una patología frecuente en nuestra Institución, son difícilmente curables únicamente con cirugía, debido a las grandes dimensiones que suelen alcanzar; presentado recurrencias que requieren reintervención; la radioterapia aunque ha demostrado ser eficaz no se encuentra libre de efectos secundarios. Aún con estas 2 modalidades de tratamiento, es frecuente que no se logre el control tumoral.

El conocimiento de un predictor de recurrencia basado en la patogénesis tumoral de los adenomas hipofisarios permitirá plantear nuevas opciones de tratamiento en beneficio de la calidad y cantidad de vida de los pacientes.

## **2. OBJETIVO DEL ESTUDIO**

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos :

Evaluar el valor predictivo de la expresión VEGF para recurrencia en adenomas hipofisarios no funcionales.

## **3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO**

Conocer un predictor de recurrencia en este tipo de tumores permitirá mejores estrategias de tratamiento en esta patología tan frecuente en nuestra Institución.

## **4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

- Análisis de tejido fresco obtenido durante su cirugía en adenomas de hipófisis
- Conteo de mitosis por campo
- Clasificación hormonal de adenomas
- Determinación de Ki67
- Determinación de VEGF y KDR

Todos los marcadores se realizarán con inmunohistoquímica y Western Blot.

## **5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO**

No existe ningún riesgo para el paciente. Los procedimientos a realizar involucrarán únicamente una porción del espécimen histopatológico y se llevarán a cabo como estudios adicionales. Los estudios de histopatología que se realizan de manera rutinaria en la institución no tendrán ninguna modificación.

## **6. ACLARACIONES**

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aún cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.



## 7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibí una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

---

**Firma del participante o del padre o tutor**

\_\_\_\_\_  
**Testigo 1**

\_\_\_\_\_  
**Testigo 2**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

\_\_\_\_\_  
**Fecha**

**Esta parte debe ser completada por el Investigador:**

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

**Firma del investigador**

**Fecha**



## 8. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

**Título del protocolo: “Factor de crecimiento endotelial vascular como predictor de recurrencia en adenomas hipofisarios no funcionales”**

Investigador principal: Sara Patricia Pérez Reyes

Sede donde se realizará el estudio: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

Nombre del participante:

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea el paciente)

**Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.**

\_\_\_\_\_  
Firma del participante o del padre o tutor

\_\_\_\_\_  
Testigo

\_\_\_\_\_  
Testigo

c.c.p El paciente.

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Fecha

**(Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en poder del paciente)**