

Evaluación por inmunohistoquímica de la expresión de hormonas hipofisarias y del marcador de proliferación celular Ki-67 en tejido de adenomas causantes de acromegalia

Julio Brito¹, Lya Sáez², Melchor Lemp³, Claudio Liberman¹, Harold Michelsen¹, A Verónica Araya¹.

Immunohistochemistry for pituitary hormones and Ki-67 in growth hormone producing pituitary adenomas

Background: Growth hormone (GH) producing adenomas, frequently express several hormones. This condition could confer them a higher proliferative capacity. Ki-67 is a nuclear protein antigen that is a marker for proliferative activity. **Aim:** To measure the immunohistochemical hormone expression in pituitary adenomas, excised from patients with acromegaly. To determine if the plurihormonal condition of these adenomas is associated with a higher proliferative capacity, assessed through the expression of Ki-67. **Material and methods:** Forty one paraffin embedded surgical samples of pituitary adenomas from patients with acromegalia were studied. Immunohistochemistry for GH, prolactin (PRL), follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), thyroid stimulating hormone (TSH), adrenocorticotropin (ACTH) and for the expression of Ki-67 was carried out. **Results:** All samples were positive for GH. Twenty seven had positive staining for PRL, 12 had positive staining for glycoproteic hormones and 11 for PRL and one or more glycoproteic hormones. Mean staining for Ki-67 was $2.6 \pm 3.3\%$. There were no differences in the expression of this marker between mono or plurihormonal tumors. The expression was neither associated with extrasellar extension. **Conclusions:** Half of GH producing pituitary adenomas are plurihormonal. There are no differences in the expression of Ki-67 between mono and plurihormonal adenomas (Rev Méd Chile 2008; 136: 831-6).
(Key words: Acromegaly; Ki-67 protein, human; Human growth hormone)

Recibido el 10 de octubre, 2007. Aceptado el 27 de marzo, 2008.

¹Sección Endocrinología, Departamento de Medicina; ²Departamento de Anatomía Patológica; ³Departamento de Neurología y Neurocirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Correspondencia a: Dra. Verónica Araya Q. Sección de Endocrinología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Santos Dumont 999, Independencia. Santiago, Chile. Fax: 56-2-7776891. E mail: varaya@redclinicauchile.cl

La acromegalia es el cuadro clínico derivado del exceso de hormona de crecimiento o somatotropina (GH), secretada por un tumor de localización hipofisaria en más de 95% de los casos¹.

Sólo 60% de los tumores provenientes de pacientes con acromegalia corresponden a adenomas somatotropos puros, 25% son adenomas mixtos de células somato y mamotropas, 10% son adenomas de células mamosomatotropas y 5% corresponde a adenomas acidófilos derivados de un *stem cell* primordial y que representaría al progenitor común de las células de GH y prolactina (PRL)²⁻⁵.

La caracterización inmunohistoquímica y estudios ultraestructurales han permitido demostrar que los adenomas hipofisarios de pacientes acromegálicos no sólo expresan y secretan GH, sino que también muestran localización concomitante de otras hormonas como PRL u hormonas glicoproteicas como la tiroestimulante (TSH), folículoestimulante (FSH) o luteinizante (LH)^{6,7}. Con respecto a la citogénesis de los adenomas plurihormonales, se ha sugerido que ellos pueden derivar de un *stem cell* primordial plurihormonal que está sometido a una diferenciación multidireccional y es capaz de producir más de una hormona^{8,9}. Probablemente, el factor transcripcional específico de la hipófisis Pit-1, que regula la síntesis de GH, PRL y TSH, esté involucrado en la citodiferenciación de estos adenomas¹⁰.

La expresión de GH/PRL conferiría una mayor capacidad tumorigénica de las células de la hipófisis anterior. En cambio, la presencia simultánea en tumores de GH y subunidad alfa de hormonas glicoproteicas puede corresponder a la proliferación de una subpoblación normal de células de la hipófisis anterior¹¹.

Algunos aspectos histológicos, como la distribución intracelular de citokeratina, la densidad de los gránulos y la presencia de Ki-67, se han asociado a recurrencia y capacidad de invasión de los adenomas hipofisarios, principalmente hacia el seno cavernoso^{2,12}.

El Ki-67 es un antígeno proteico nuclear expresado en todo el ciclo celular (G1, M, G2, y S), excepto en G0. A diferencia del índice mitótico que sólo evidencia división celular actual, el Ki-67 es un fiel marcador de la actividad proliferativa. Su expresión sería directamente proporcional al tamaño, capacidad de invasión y recidiva de adeno-

mas hipofisarios^{13,14}. Un aspecto interesante es su correlación con el oncogén subtipo 4 de receptor de factor de crecimiento fibroblástico, FGFR4, cuya expresión en tejido hipofisario ha sido relacionada con proliferación celular y crecimiento tumoral¹⁵.

Como existe un alto porcentaje de pacientes acromegálicos que no logran curación bioquímica luego de una primera intervención neuroquirúrgica¹⁶, y que requerirán una segunda cirugía u otras terapias para conseguir este objetivo, a los clásicos factores de riesgo de fracaso quirúrgico, como la edad al momento del diagnóstico, tamaño, extensión tumoral y concentración de GH inicial, sería interesante incorporar algunos aspectos inmunohistoquímicos de los adenomas.

En nuestro medio no se dispone de información acerca de la expresión de las diferentes hormonas hipofisarias y de Ki-67 en adenomas hipofisarios, por lo cual, los objetivos de nuestro estudio fueron: evaluar en adenomas secretores de GH provenientes de pacientes intervenidos por acromegalia, la expresión de las hormonas de la hipófisis anterior por técnica de inmunohistoquímica; establecer si la condición plurihormonal se asocia con un mayor índice de proliferación del marcador Ki-67 y evaluar si existen diferencias clínicas según la expresión de otras hormonas y de Ki-67.

MATERIAL Y MÉTODO

Del archivo de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile se rescataron las muestras quirúrgicas incluidas en parafina de 45 pacientes operados en el Servicio de Neurocirugía entre los años 1985 y 2004, por el diagnóstico de acromegalia documentado por prueba de tolerancia a la glucosa. Después de la revisión de las placas histológicas se descartaron 4 (2 hipófisis normales, 1 con fibrosis isquémica y 1 muestra no diagnóstica). Además, se revisó la ficha clínica de cada caso. En todos ellos la cirugía fue el primer tratamiento.

En las 41 muestras en las que se identificó tejido tumoral, se investigó por técnica de inmunohistoquímica la localización concomitante de GH, PRL, FSH, LH, TSH, ACTH y también, la expresión de Ki-67. La indemnidad del tejido y la calidad de la tinción inmunohistoquímica, fueron certificadas por un patólogo experto.

Las muestras del tejido incluido fueron cortadas en secciones de 4 µm, desparafinadas y rehidratadas con agua destilada. Se incubaron en presencia de anticuerpo primario por 30 min a temperatura ambiente. El set de anticuerpos usados fue anti GH, PRL, FSH, LH, TSH (Biosgenes), anti ACTH (Neomarkers), Ki-67 (Dakocitomation). Enseguida se incubaron por 20 min en presencia de anticuerpo secundario biotinilado y, posteriormente, se agregó estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, para finalmente revelar con solución cromógena DAB (3,3'-diaminobenzidina), por un máximo de 20 min. La actividad peroxidasa intrínseca fue previamente bloqueada por incubación en peróxido de hidrógeno al 3% por 3 min. Se realizó tinción suave de núcleos con hematoxilina-eosina.

Para medir la presencia de Ki-67, se realizó primariamente la recuperación de los antígenos nucleares, mediante incubación en *buffer* Tris-EDTA, a pH 9, en microondas por 6 min a potencia máxima y 1 h a baja potencia. Se consideró positiva la presencia de marcación para Ki-67 en citoplasma difuso o Golgi, examinando el área más densa, en donde se contaron 100 a 200 núcleos por campo, dando un porcentaje en base al recuento. Si en 500 núcleos aparece escasa marca, se considera <1%. Según se define en la literatura, una marcación inferior a 5% es considerada baja y una marcación >10% de las células es un alto índice de proliferación y se relaciona con capacidad de invasión¹⁷.

El examen microscópico se realizó con aumento de 400x, usando grilla ocular, en un microscopio NIKON Alphaphot 2.

Este protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Estadística. Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar. Se utilizaron los tests de Mann-Whitney y χ^2 con corrección de Yates para evaluar las diferencias entre medias y proporciones respectivamente. Se consideró una diferencia significativa a un $p < 0,05$.

RESULTADOS

De los 41 tumores, sólo 4 correspondieron a microadenomas. En todos ellos se observó tinción

positiva (+) para GH. Catorce (34%) fueron monohormonales para GH y en 27 (66%) se observó además tinción (+) para una o más hormonas. En la Tabla 1 se observan las combinaciones presentes en todos los adenomas con sus respectivos porcentajes.

En la Tabla 2 se presentan las características clínicas de los pacientes con adenomas monohormonales y los con adenomas plurihormonales. No hubo diferencia significativa para sexo, edad o tiempo de evolución de la enfermedad. Tampoco hubo diferencia significativa entre los grupos para los niveles de GH y PRL preoperatorios. Los niveles séricos de TSH, FSH y LH estaban dentro del rango normal en todos los casos. El porcentaje de casos que presentó expansión extraselar (supra o paraselar) en la tomografía axial computada (TAC) o resonancia nuclear magnética (RNM) de silla turca, fue similar en los dos grupos. No hubo diferencia en el porcentaje de curación, entre el grupo monohormonal y el grupo plurihormonal.

Inmunohistoquímica para Ki-67. En 32 de los 41 tumores, se obtuvo muestra suficiente para realizar la tinción inmunohistoquímica para Ki-67.

El valor promedio del porcentaje de marcación Ki-67 fue 2,64±3,3%, rango 1% a 15%.

No se encontró una diferencia significativa entre los adenomas monohormonales y los plurihormonales para el porcentaje de marcación promedio de Ki-67 (Tabla 3) pero, los 3 tumores que presentaron un porcentaje mayor o igual a 10% fueron plurihormonales (un tumor GH/FSH(+)/PRL (-) y 2 tumores GH/PRL (+)). Los 3 correspondieron a macroadenomas.

Tabla 1. Patrones de inmunohistoquímica en 41 adenomas hipofisarios secretores de GH

Hormonas	n	%
GH	14	34,1
GH + PRL	4	9,8
GH + FSH	9	22,0
GH + TSH	1	2,4
GH + PRL + FSH	8	19,5
GH + FSH + TSH	1	2,4
GH + PRL + FSH + TSH	3	7,3
GH + FSH + TSH + LH	1	2,4
Total	41	100

Tabla 2. Características clínicas en 41 pacientes portadores de adenomas hipofisarios secretores de GH, comparados según la presencia de inmunotinción para otras hormonas en el tejido resecado

	GH monohormonal n =14	Plurihormonal n =27
Sexo (H/M)	4/10	9/18
Edad (años)	45,9±11,5 (33-65)	44,3±14 (16-65)
Tiempo de evolución (años)	6,8±8,2 (0,5-15)	6,6±8,2 (0,5-30)
GH basal (ng/ml)	30,7±23,4 (7-81)	28,9±24,3 (4,8-125)
PRL basal (ng/ml)	33,9±37,8 (2,1-122,8)	46,2±73,7 (3,1-330,5)
Expansión extraselar	10/14 (71,4%)	12/27 (44,4%)
% Curación	4/14 (28,6%)	5/27 (18,5%)

Los resultados se presentan como promedio ± DS. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los parámetros evaluados.

mas y el tiempo promedio de evolución del cuadro clínico de los pacientes fue 1,5 años. El porcentaje de marcación Ki-67 más alto (15%) se observó en el tumor del paciente más joven de la serie (16 años), que curó después de una segunda intervención quirúrgica y radioterapia.

Al comparar los tumores con y sin inmunotinción presente para PRL, y los con y sin expansión extraselar, tampoco observamos una diferencia significativa en el porcentaje de marcación de Ki-67 (Tabla 3).

DISCUSIÓN

En este estudio demostramos que más de 50% de los adenomas causantes de acromegalia de nues-

tra serie presentó inmunotinción positiva para otra(s) hormona(s) de la hipófisis anterior, además de GH, lo que concuerda con lo descrito previamente en la literatura sobre la alta frecuencia de la característica plurihormonal de estos adenomas hipofisarios^{5,6,18}.

En nuestra serie no observamos diferencia en los niveles de GH sérica ni en el porcentaje de adenomas con expansión extraselar entre los tumores plurihormonales y los monohormonales. Otros autores han demostrado que los niveles de GH en plasma se correlacionan en forma inversa con el porcentaje de inmunorreactividad para GH presente en el tejido, pero no han encontrado asociación entre la característica plurihormonal y el tamaño del tumor¹⁸. Otros han postulado que los adenomas GH/PRL (+) tendrían una mayor capacidad prolifera-

Tabla 3. Porcentaje de marcación Ki-67 en tejido de 32 adenomas hipofisarios con inmunotinción positiva para GH

	n	% de marcación Ki-67
GH monohormonal	10	1,8 ± 1,7
Plurihormonal	22	3 ± 3,8
Según inmunotinción para PRL		
PRL (+)	12	3,2 ± 4,1
PRL (-)	20	2,2 ± 2,4
Según expansión extraselar (ES)		
Con ES	17	2,58 ± 3,9
Sin ES	15	2,73 ± 2,57

No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados.

tiva y que la expresión de hormonas glicoproteicas pudiera representar un estadio más diferenciado y, por ende, menos proclive a la proliferación¹⁰. En los casos evaluados, no observamos diferencias en la proporción de adenomas con tinción para PRL y sin tinción para PRL, que presentaron expansión extraselar en la TAC o RNM de silla turca, ni en el porcentaje de marcación de Ki-67 en ambos grupos de adenomas. Tampoco hubo diferencia en el promedio de la PRL sérica (datos no mostrados). Este hallazgo es similar a lo descrito por otros autores, que han demostrado que los adenomas mamosomatotropos o mixtos somatotropos-lactotropos, se manifiestan clínicamente por acromegalia con niveles de PRL normales en la mayoría de los casos^{5,18,19}. Aparentemente, la inmunoreactividad para una hormona específica no necesariamente se asocia con el aumento de los niveles séricos o con la clínica correspondiente probablemente, porque secretan hormonas biológicamente inactivas.

El antígeno nuclear Ki-67 ha sido reconocido como un marcador de proliferación celular y su expresión sería directamente proporcional a la capacidad de invasión y recidiva tumoral^{20,21}. En adenomas hipofisarios se ha descrito un porcentaje de tinción Ki-67 entre 1,1% y 5,5%. Para los tumores secretores de GH, se describió en dos series 0,92% y 2,18%^{20,21}, respectivamente. En nuestra serie, el porcentaje de marcación promedio fue levemente superior, 2,64% y en los adenomas plurihormonales observamos una tendencia a ser mayor a 3%. Incluso 3 de ellos presentaron un porcentaje de tinción Ki-67 igual o superior a 10%, lo que corresponde a un alto índice de proliferación de acuerdo a lo descrito por Thapar et al²². Un aspecto interesante fue que estos casos correspondieron a macroadenomas, en los cuales el tiempo de evolución transcurrido desde el inicio de la sintomatología hasta el momento del diagnóstico no superó los dos años. Aunque el número de muestras analizadas es reducido para aseverar que

la condición plurihormonal, asociada a un elevado porcentaje de Ki-67, confiere mayor capacidad de proliferación y un mayor riesgo de crecimiento e invasión tumoral, esta observación es altamente sugerente y se debería confirmar con el análisis futuro de un mayor número de adenomas.

En la literatura aún existen controversias respecto a si Ki-67 es un marcador biológico confiable para predecir la capacidad de proliferación y recidiva en adenomas hipofisarios, ya que se ha observado una superposición entre adenomas indolentes y tumores invasores^{2,20-24}. Sin embargo, hay que señalar que estas series están compuestas mayoritariamente por adenomas no funcionantes y que no se ha analizado dirigidamente a los adenomas secretores de GH. Además, es importante tener en cuenta al comparar resultados cuantitativos, las diferencias en la sensibilidad de los diferentes *kits* de anticuerpos para el antígeno Ki-67²⁵.

Concluimos que los adenomas secretores de GH son plurihormonales en más de 50% de los casos. Aunque no fue demostrado estadísticamente, los adenomas plurihormonales presentan una tendencia a un mayor índice de proliferación evaluado con el antígeno nuclear Ki-67. Se requiere analizar un mayor número de muestras para establecer su utilidad en la caracterización inmunohistoquímica de los adenomas secretores de GH y en el pronóstico de los pacientes con acromegalia.

Agradecimientos

Agradecemos a la Oficina de Apoyo a la Investigación Clínica (OAIC) del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y al Laboratorio Chile por ayudarnos con el financiamiento de los reactivos necesarios para el estudio. También agradecemos al Sr. Gabriel Sánchez Jorquera por su colaboración desinteresada en la realización de las inmunohistoquímicas y a todos los miembros de la sección de Endocrinología que han sido los médicos tratantes de estos pacientes.

REFERENCIAS

1. AACE Acromegaly Guidelines Task Force. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and treatment of acromegaly. *Endocrine Practice* 2004; 10: 213-25.
2. AL-SHRAIM M, ASA SL. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: What is new? *Acta Neuropathol* 2006; 111: 1-7.
3. MATSUNO A, TERAMOTO A, TAKEKOSHI S, SANNO N, OSAMURA RY, KIRINO T. Expression of plurihormonal mRNAs in somatotrophic adenomas detected using a nonisotopic *in situ* hybridization method: compari-

- son with lactotrophic adenomas. *Hum Pathol* 1995; 26: 272-9.
4. SAKHAROVA AA, DIMARAKI EV, CHANDLER WF, BARKAN AL. Clinically silent somatotropinomas may be biochemically active. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2117-21.
 5. HO DM, HSU CY, TING LT, CHIANG H. Plurihormonal pituitary adenomas: immunostaining of all pituitary hormones is mandatory for correct classification. *Histopathology* 2001; 39: 310-9.
 6. ASA SL, KOVACS K, HORVATH E, LOSINSKI NE, LASZLO FA, DOMOKOS I ET AL. Human fetal adenohypophysis. Electron microscopic and ultrastructural immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology* 1988; 48: 423-31.
 7. MATSUNO A, TERAMOTO A, TAKEKOSHI S, SANNO N, OSAMURA RY, KIRINO T. GH, PRL, and ACTH gene expression in clinically nonfunctioning adenomas detected with nonisotopic *in situ* hybridization method. *Endocr Pathol* 1995; 6: 13-20.
 8. KAMITANI H, MASUZAWA H, KANAZAWA I, KUBO T. The multihormonal character of pituitary adenomas: Immunoelectron microscopic studies. *Neuropathology* 1999; 19: 40-50.
 9. MCCOMB DJ, BAYLEY TA, HORVATH E, KOVACS K, KOURIDES IA. Monomorphous plurihormonal adenoma of the human pituitary. A histologic, immunocytologic and ultrastructural study. *Cancer* 1984; 53: 1538-44.
 10. HERMAN V, FAGIN J, GONSKY R, KOVACS K, MELMED S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1427-33.
 11. INADA K, ODA K, UTSUNOMIYA H, ITOH J, OSAMURA RY. Immunohistochemical analysis of GH-producing adenomas with special emphasis on plurihormonality of individual tumor cells by double staining. *Tokai J Exp Clin Med* 1992; 17: 213-22.
 12. 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. *Neurosurg Focus* 2005; 19: E11.
 13. ZHAO D, TOMONO Y, NOSE T. Expression of P27kip1 and Ki-67 in pituitary adenomas: an investigation of marker of adenoma invasiveness. *Acta Neurochir (Wien)* 1999; 141: 187-92.
 14. PAN LX, CHEN ZP, LIU YS, ZHAO JH. Magnetic resonance imaging and biological markers in pituitary adenomas with invasion of the cavernous sinus space. *J Neurooncol* 2005; 74: 71-6.
 15. QIAN ZR, SANO T, ASA SL, YAMADA S, HORIGUCHI H, TASHIRO T ET AL. Cytoplasmic expression of fibroblast growth factor receptor-4 in human pituitary adenomas: relation to tumor type, size, proliferation, and invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1904-11.
 16. CARRASCO C, VÉLIZ J, ROJAS D, WOHLK N. [Results of treatment for acromegaly in 53 patients: it is time of intervention]. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 989-96.
 17. 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: 99-106.
 18. TROUILLAS J, SASSOLAS G, GUIGARD MP, FONLUPT P, ANSANELI-NAVES L, PERRIN G. Relationships between pathological diagnosis and clinical parameters in acromegaly. *Metabolism* 1996; 45 Suppl 1: 53-6.
 19. ASA SL, KOVACS K, HORVATH E, SINGER W, SMYTH HS. Hormone secretion *in vitro* by plurihormonal adenomas of the acidophil cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 68-75.
 20. MASTRONARDI L, GUIDUCCI A, SPERA C, PUZZILLI F, LIBERATI F, MAIRA G. Ki-67 labelling index and invasiveness among anterior pituitary adenomas: analysis of 103 cases using the MIB-1 monoclonal antibody. *J Clin Pathol* 1999; 52: 107-11.
 21. TURNER HE, WASS JA. Are markers of proliferation valuable in the histological assessment of pituitary tumours? *Pituitary* 1999; 1: 147-51.
 22. SCHREIBER S, SAEGER W, LÜDECKE DK. Proliferation markers in different types of clinically non-secreting pituitary adenomas. *Pituitary* 1999; 1: 213-20.
 23. HONEGGER J, PRETTIN C, FEUERHAKE F. Expression of Ki-67 antigen in nonfunctioning pituitary adenomas: correlation with growth velocity and invasiveness. *Journal of Neurosurgery* 2003; 99: 674-9.
 24. DUBOIS S, GUYETANT S, MENEI P, RODIEN P, ILOUZ F, VIELLE B ET AL. Relevance of Ki-67 and prognostic factors for recurrence/progression of gonadotropic adenomas after first surgery. *Eur J Endocrinol* 2007; 157: 141-7.
 25. LINDBOE CF, VON DER OHE G, TORP SH. Determination of proliferation index in neoplasms using different Ki-67 equivalent antibodies. *APMIS* 2003; 111: 567-70.