

ESTUDIO INMUNOCITOQUIMICO DE LAS HORMONAS DE LA ADENOHIPOFISIS HUMANA

I. HORMONA DEL CRECIMIENTO

G. ESCOVAR, H. HANSEN, G. URIBE

Con el objeto de verificar el concepto de que la hormona del crecimiento está contenida en poblaciones de células acidófilas, se realizó la detección inmunocitoquímica de la hormona en cortes histológicos de adenohipófisis humana fijados en formalina. Se utilizó la reacción inmunocitoquímica de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP). Se encontró que las células detectadas inmunocitoquímicamente como productoras de la hormona del crecimiento (GH), corresponden a las células acidófilas naranjas en la reacción de tinción naranja G. Delineadas clara y específicamente por el método PAP, estas células fueron observadas formando filas a

lo largo de sinusoides. Se presenta la ultraestructura de esta células y se compara con las observaciones hechas por otros autores. Se describe además la utilidad del método para detectar la hormona de crecimiento en adenomas de la pituitaria y sus metástasis. Finalmente se discute el papel de la hormona en el crecimiento y se analizan las perspectivas de investigación y la utilización práctica de ella en el tratamiento de algunas entidades clínicas y en el incremento del crecimiento.

INTRODUCCION

Es propósito de este trabajo el describir un estudio inmunocitoquímico de las diferentes hormonas de la adenohipófisis humana. Con este fin presentaremos separadamente los aspectos histoquímicos de cada una de las hormonas producidas por esta glándula, la metodología utilizada en la identificación de las células que las producen en condiciones normales y patológicas, así como los resultados obtenidos. Finalmente se discutirá sobre los mecanismos de acción de cada una de las

Dra. Genarina Escovar V.: Profesora Asistente, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. Actualmente en entrenamiento: Department of Pathology, M.D. Anderson Hospital and Tumor Research Institute, Texas Medical Center, Houston Texas, 77030, U.S.A.; Dr. Henry Hånsen V.: Profesor Asociado, Departamento de Microbiología y Parasitología Sección Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. Actualmente en entrenamiento: Department of Virology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston Texas, 77030, U.S.A.; Dr. Gonzalo Uribe Botero: Profesor Asistente, Department of Pathology, Baylor College of Medicine, Texas Medical Center and Staff Pathologist Veterans Administration Hospital, Medical Center, Houston Texas, 77211, U.S.A.

Solicitud de separatas al Dr. Hansen.

hormonas, la importancia y la aplicación práctica del procedimiento inmunocitoquímico de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP), en la detección de estos compuestos.

La glándula pituitaria o hipófisis es reconocida universalmente como una glándula endocrina debido a que no posee ductos y los productos que sus células secretan son vertidos directamente en canales vasculares (1). La hipófisis está compuesta de dos lóbulos discretos, la adenohipófisis o lóbulo anterior y la neurohipófisis o lóbulo posterior. La adenohipófisis comprende la Pars tuberalis, la Pars intermedia y la Pars distalis; la neurohipófisis está formada por la Pars nervosa, el infundibulum, el tallo infundibular y la eminencia media. A pesar de su pequeño tamaño la adenohipófisis elabora siete hormonas: la hormona del crecimiento (GH) o somatotropina (STH); la prolactina (PH); la tirotropina (TSH); las gonadotropinas que corresponden a la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH); los otros tres productos de la adenohipófisis son la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) y la lipotropina (LPH).

De las anteriores hormonas, la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PH), así como la hormona estimulante de los melanocitos (MSH), están sujetas a control hipotalámico positivo y negativo. Estas hormonas, en contraste con las otras hormonas de la pituitaria anterior, no tienen tejidos endocrinos como "órganos efectoros". Las restantes hormonas de la pituitaria anterior TSH, ACTH, LH y FSH, están bajo control positivo por el hipotálamo y bajo control negativo por tejidos endocrinos específicos que a su vez son su órgano efector. La hormona lipotrópica (LPH) es regulada paralelamente con la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y está bajo predominante influencia hipotalámica (2).

Histoquímica de la adenohipófisis. La nomenclatura clásica describe tres tipos principales de células en la adenohipófisis: acidófilas, basófilas y cromóforas. Esta clasificación está basada en el uso de colorante de tipo Mallory. En 1940, Romeis (3) contribuyó significativamente al desarrollo de la clasificación histoquímica de las células de la adenohipófisis basada en el uso de diferentes colorantes. Si las células de la adenohipófisis de una mujer lactante son teñidas con eritrosina —naranja G o carmín— naranja G se distinguen dos tipos de células acidófilas, uno de los cuales tiene afinidad por el colorante naranja y corresponde a las células Alfa (α) y el otro por el carmín (colorante eritrosinofílico) y corresponde a las células acidófilas Eta (η).

Las células que se tiñen con el colorante aldehído tionina —PAS— naranja G son generalmente células basófilas que pueden ser divididas en dos categorías: las células PAS-rojas o células Beta 1 (β -1) y las células aldehído tionina azules o células Beta 2 (β -2). Las células basófilas también comprenden las células Gamma (γ) y las Delta (δ), las cuales pueden ser mejor definidas como células cuyos gránulos secretorios revelan una reacción de ácido periódico de Schiff (PAS) positiva, después de que los tejidos han sido tratados con amilasa, lo cual indica que estos gránulos contienen glicoproteínas. En cuanto a las células cromóforas de la adenohipófisis existe controversia sobre su existencia. Sin embargo, quienes las describen las detallan como células que tienen unos pocos gránulos específicos. Algunos autores prefieren referirse a las células cromóforas como células transitoriamente degranuladas, pero otros las describen como células que podrían dar origen a los diferentes tipos de células en la adenohipófisis (4). La Tabla 1 muestra una información actualizada de la nomenclatura histoquímica y funcional de las células de la adenohipófisis. Además, se incluye un análisis ultraestructural comparativo de los gránulos de secreción en estas células (5).

Tabla 1. Nomenclatura funcional, inmunocitoquímica, tintorial y ultraestructural de las células de la adenohipófisis humana.

| Nomenclatura funcional e inmunocitoquímica | Principales acciones | Composición química y peso molecular | Nomenclatura clásica | Nomenclatura de Romels | Coloraciones especiales | Gránulos (E.M.) en humanos |
|---|--|--------------------------------------|----------------------|---|------------------------------------|---|
| Somatotropos o células GH | Acelera el crecimiento corporal. Promueve la síntesis proteica. | Proteína 21.000 | Acidófila | Alfa (α) | PAS.-; Naranja G. +; Eritrosina.-. | 350-600nm* |
| Lactotropos o células productoras de prolactina | Estimula la secreción de leche. Regula la conducta materna. | Proteína 25.000 | Acidófila | Eta (η) | PAS.-; Naranja G. ±; Eritrosina. + | 100-200nm de ancho. 600-900nm de largo. |
| Cortico-lipotropos o células ACTH/LPH | ACTH- Estimula la secreción y el crecimiento adrenocortical. LPH Modula la secreción de glucocorticoides. | Proteína 4,500 | Basófila | Beta; (β_1) | PAS. ±; Naranja G.-; Eritrosina.-. | 200-450 nm |
| Tirotropos o células TSH | Estimula el crecimiento y la secreción de la tiroides. | Glico-proteína 28.000 | Basófila | Beta ₂ (β_2) Gamma (γ) | PAS. +; Naranja G.-; Eritrosina.-. | 80-150nm |
| Gonadotropos o células FSH/LH | FSH- Estimula el crecimiento del folículo ovárico en la hembra y ermatogénesis en el cho. | Glico-proteína 50.000 | Basófila | Delta ₂ (δ_2) | PAS. +; Naranja G.-; Eritrosina.-. | Pequeños: 200-250nm Grandes: 400-450nm |
| | LH- Formación cuerpo lúteo, secreción progesterona. Testículo (células de Leydig), secreción testosterona. | Glico-proteína 26.000 | Basófila | Delta (δ) | PAS. +; Naranja G.-; Eritrosina.-. | 100-250nm |
| Melanotropos o células MSH | En mamíferos, acción por determinar. | Polipéptido | Basófila | Beta (β) | — | — |

* nm = nanómetros

I. Hormona del crecimiento (GH) o somatotropina (STH)

La hormona del crecimiento (GH) es una proteína simple que estimula el crecimiento del cuerpo después del nacimiento. Su ausencia puede resultar en condiciones patológicas tales como el Dwarfismo o enanismo pituitario; su excesiva secreción permite el desarrollo de síndromes tales como el gigantismo en la niñez y la acromegalia durante la vida adulta. En estas condiciones con alguna frecuencia ocurre la transformación de las células Alfa acidófilas en células tumorales, con la subsecuente formación de tumores sólidos denominados adenomas. En algunas otras

condiciones patológicas tales como el síndrome de Turner, existe deficiencia de esta hormona. La Figura 1 ilustra la compo-

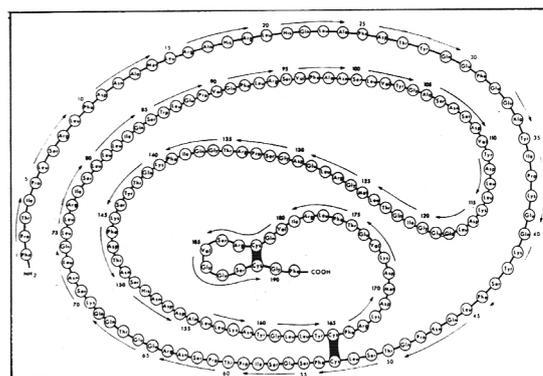


Figura 1. Secuencia de aminoácidos en la hormona de crecimiento humana (31).

sición bioquímica de la hormona del crecimiento.

Las células acidófilas Alfa que producen hormona del crecimiento han sido ampliamente estudiadas en diferentes especies animales (6). Estos estudios han revelado la presencia de granulos densamente agrupados en el citoplasma los cuales presentan un tamaño de 350 nanómetros de diámetro (7, 8). Existe poca información acerca de la naturaleza histoquímica de las células de la adenohipófisis humana y de la identificación adecuada de las hormonas originadas en ellas. Pretendiendo alcanzar los objetivos sustanciales de este trabajo se decidió identificar y estudiar por métodos histoquímicos e inmunocitoquímicos las hormonas de la adenohipófisis, empezando por la hormona del crecimiento.

MATERIAL Y METODOS

Obtención y preparación de tejidos. Las pituitarias fueron obtenidas de cinco autopsias humanas. Una de ellas provenía de un caso patológico diagnosticado como acromegalia; el paciente había muerto a los 45 años de edad y era de sexo masculino. Las otras cuatro pituitarias se seleccionaron de autopsias distintas a tumores o alteraciones de origen endocrino. Las edades de los pacientes estaban comprendidas en un rango de 30 a 45 años de edad, dos eran de sexo masculino y dos de sexo femenino. Las cuatro pituitarias fueron evaluadas como normales en estudios histológicos de hematoxilina-eosina.

Los tejidos fueron fijados en formol al 10% durante cuatro horas y embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos de cuatro mieras de espesor mediante el uso de un micrótomo automático. Los cortes histológicos se colocaron a 60°C durante 6 horas para asegurar una mejor adherencia de los tejidos a las láminas porta-objetos. En todos los casos estudiados se realizaron coloraciones de hematoxilina-eosina y

eritrosina-naranja G. Inmediatamente antes de realizar el método de peroxidasa anti-peroxidasa, se procedió a desparafinar los cortes histológicos utilizando consecutivamente las siguientes soluciones: xilol, 15 minutos; etanol al 100%, 90%, 70% por dos minutos respectivamente.

Con el objeto de remover la peroxidasa endógena presente en células sanguíneas, se utilizó el método de Burns (9), sometiendo los tejidos durante 30 minutos a tratamiento con metanol absoluto y peróxido de hidrógeno a una concentración de 0,3%. Posteriormente los tejidos se lavaron en solución salina amortiguadora de base Tris ultrapurificada (hidroximetil-aminometano; hidrocloreuro Tris 0,05 M; NaCl 0,05 M; pH 7,6), (Schwarsmann, Orangesburg, N. Y.).

Obtención y tratamiento de los antisueros utilizados en el método PAP. El antisuero anti-hormona de crecimiento (anti-GH) preparado en conejo fue obtenido de Research Resources Branch, NIAID, National Institute of Health, Bethesda, MD. U.S.A. Con el objeto de remover anticuerpos inespecíficos, este antisuero se adsorbió con hígado de ratón pulverizado (N° L-8254, Sigma, Co. St. Louis Mo. U.S.A.).

Con el objeto de remover posibles anticuerpos contaminantes antihormona prolactina, presentes en el antisuero anti-hormona de crecimiento, éste fue tratado con hormona prolactina (N°L-4876, Sigma, Chem. Co.) según procedimiento utilizado por Baker et al. (10).

Los antisueros cabra anti-conejo (inmunoglobulina G, cadenas pesadas y livianas) y el antisuero de conejo peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) fueron obtenidos de Cappel Lab. Pa, U.S.A.

Reacción de peroxidasa anti-peroxidasa. Se utilizó el procedimiento de peroxidasa anti-peroxidasa sin anticuerpo

marcado descrito por Sternberger (11, 12), el cual consiste esencialmente en lo siguiente:

1. Someter el tejido en estudio (adenohipófisis) a reaccionar con el antisuero específico anti-hormona de crecimiento (anti-GH) con el objeto de detectar el antígeno (GH) presente en las células de la glándula.

2. Utilizar un segundo antisuero como anticuerpo ligante. En este estudio se utilizó inmunoglobulina G de cabra anti-conejo.

3. Agregar un tercer suero purificado preparado en conejo el cual contiene el complejo soluble peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) unido a anticuerpos anti-peroxidasa.

4. Después de cada período de incubación con los antisueros previamente mencionados lavar los tejidos durante 10 minutos con solución salina de base Tris pH 7,6 que contenga una concentración de suero normal de cabra al 2%.

5. Tratar los tejidos con solución de tetracloruro 3.3' de diamino-benzidina al 0,05% (grado II, N° 5637, Sigma) en solución Tris, pH 7,6. La reacción enzimática se desarrolla con peróxido de hidrógeno (30 microlitros al 30%) como sustrato y con hidrócloruro de diamino-benzidina como donador de electrones. El resultado final de la reacción es la formación de un producto insoluble el cual varía de color café claro a oscuro dependiendo de la intensidad de la reacción.

6. Posteriormente, lavar los tejidos nuevamente con solución salina Tris, teñidos con hematoxilina de Harris, contrastados con solución sobresaturada de carbonato de litio, deshidratados en concentraciones crecientes de etanol (15%, 50%, 75%, 95%, 100%) por períodos de 5 minutos para cada alcohol y clarificados en xilol absoluto por 10 minutos. Las láminas

fueron montadas en Permount (Fisher Scie. Co.).

Examen microscópico. Los tejidos fueron examinados por microscopía de luz, utilizándose un microscopio Zeiss con cámara incorporada. Las fotografías fueron tomadas con película Ektachrome, Et 135-20, tungsteno (Eastman, Kodak, N. Y.).

Controles de la especificidad de la reacción inmunocitoquímica (PAP). Con el fin de asegurar la especificidad de la reacción en la detección de la hormona del crecimiento humana (hGH) en células de la adenohipófisis, se utilizaron los siguientes controles:

Sustitución del primer antisuero por suero pre-inmune al realizar el método PAP, en los tejidos estudiados.

Adsorción del suero anti-hormona de crecimiento humana (anti-hGH), con hormona de crecimiento humana (hGH), obtenida comercialmente de Boehringer Mannheim Biochemicals (Indiana, U.S.A.), según método de Baker et al. (10), con el objeto de averiguar la reacción específica del antisuero con su propia hormona. Posterior aplicación del método PAP tratando los tejidos con el antisuero adsorbido.

Método de inmunofluorescencia. Se utilizó además del método PAP, el procedimiento de inmunofluorescencia indirecta aplicado a tejido de adenohipófisis en cortes de parafina. Los tejidos fueron desparafinados en xilol durante una hora y posteriormente se trataron con tripsina (grado puro, N° T-360, Fisher Sci. Co., N.J., U.S.A.) pH 7,8 según método de Qualman et al. (13).

Por este método la hormona GH fue detectada utilizando consecutivamente suero anti-hGH, preparado en conejo y obtenido de NIH (National Institute of Health, Bethesda MD., U.S.A.); como

conjugado fluorescente se utilizó un suero de cabra (IgG) anti-conejo (Dako, Lab. N.Y., U.S.A.). Las láminas fueron montadas en elvanol y se examinaron con microscopio de fluorescencia (Zeiss). Las fotografías fueron tomadas con película Ektachrome ASA 400 (EL-135-66, Kodak) y sometidas a revelado especial Kodak ESP.

Preparación del material para microscopía electrónica. Segmentos de la adenohipófisis fueron fijados en solución de glutaraldehído al 2,5% durante 2 horas. El espécimen fue posteriormente fijado en tetróxido de osmio al 2% durante 30 minutos y deshidratado en gradientes de etanol (30%, 50%, 75%, 95%; 100% dos veces), durante 15 minutos por cada uno respectivamente. Posteriormente fueron colocados en solución de óxido de propileno (N° 2068, Kodak) durante 20 minutos, 2 veces; e infiltrados durante 24 horas a 60° C en una mezcla de resina epón-araldita (14, 15).

Se utilizó un ultramicrotomo L.K.B. 8800, para realizar cortes de 1 a 2 micras de espesor, las cuales fueron coloreadas con azul de toluidina con el objeto de seleccionar áreas representativas. Los cortes ultrafinos de las áreas seleccionadas fueron colocados en rejillas de cobre (300 mesh, Ted Pella Inc. Ca. U.S.A.) y teñidas con solución saturada de acetato de uranio preparada en etanol al 50%, durante 5 minutos. Posteriormente fueron colocadas en solución de citrato de plomo (0,04 gramos de Pb (C₆H₆O₇)₂ · 3H₂O en 10 ml de H₂O destilada; más 0,1 ml de NaOH, ION), durante 5 minutos. Se usó para el estudio de ultraestructuras un microscopio Phillips, Modelo 301.

RESULTADOS

Características tintoriales. Cuando se aplicó la coloración eritrosina-naranja G, se encontró que un porcentaje elevado de

las células de la adenohipófisis se tiñeron de naranja y contenían gránulos citoplasmáticos. Estas células, de acuerdo a la clasificación clásica de Romeis, corresponden a células acidófilas involucradas en la producción de hormona del crecimiento. Las células que tomaron color rojo con la coloración naranja G correspondieron a células eritrosinofílicas, productoras de prolactina. La Figura 2 ilustra los dos tipos celulares en la adenohipófisis humana normal. La Figura 3 ilustra la coloración eritrosina-naranja G en un adenoma hipofisiario de tipo acidófilo, hallazgo patológico en el caso del paciente con acromegalia.

Hallazgos inmunocitoquímicos. Mediante el uso de la técnica de inmunoperoxidasa empleando suero anti-hormona de crecimiento (anti-GH) fue posible detectar clara y específicamente las células que producen esta hormona en la adenohipófisis. La reacción se caracteriza por la formación de un producto de color café, evidente en el citoplasma celular. La intensidad del color parece estar relacionada con la cantidad de hormona presente en cada célula. Algunos gránulos de apariencia fina fueron observados en el citoplasma, pero la reacción también se presentó en forma difusa. La Figura 4 ilustra la morfología general de las células acidófilas productoras de hormona del crecimiento (GH) en la adenohipófisis humana normal. Estas células se caracterizan por presentar bordes redondos y en general forma ovoide. Además, muy frecuentemente se encuentran alineadas a lo largo de sinusoides o canales vasculares. Su distribución es uniforme en la adenohipófisis, pero se encontró un número menor de células hacia la región superior de la glándula.

Significativamente, en el adenoma hipofisiario de tipo acidófilo el citoplasma celular se tiñó intensamente al reaccionar con el suero anti-hormona del crecimiento (anti-GH) en el método PAP. La reacción fuertemente positiva puede

correlacionarse con una excesiva producción de la hormona en la acromegalia (Figura 5).

Al comparar las células productoras de hormona de crecimiento en pituitarias de pacientes de sexo masculino y femenino, se encontró un mayor número de células con reacción de peroxidasa fuertemente positiva en los pacientes de sexo masculino. En las pituitarias de pacientes de sexo femenino, las células productoras de hormona de crecimiento fueron menos abundantes.

La Figura 6 ilustra la reacción negativa del método PAP en células acidófilas de la adenohipófisis humana cuando son expuestas al suero anti-hormona de crecimiento previamente adsorbido con hormona de crecimiento. Allí no se presentó ningún tipo de reacción ni se detectaron depósitos de peroxidasa ya que, como era de esperar, los anticuerpos anti-hormona de crecimiento fueron removidos por la adsorción. También se obtuvieron resultados negativos en el método PAP al sustituir el suero anti-hormona de crecimiento (anti-GH) por suero pre-inmune.

Al utilizar el método de inmunofluorescencia indirecta aplicada a tejidos en parafina, se detectó también la hormona de crecimiento en las células de la adenohipófisis. El empleo de este método conserva aceptablemente la morfología general del tejido. La Figura 7 ilustra la reacción positiva de inmunofluorescencia.

Hallazgos ultraestructurales. Las células que producen hormona del crecimiento se caracterizan ultraestructuralmente por presentar un gran número de gránulos electrodensos en el citoplasma, los cuales presentan diámetro de 300 a 600 nanómetros, siendo la mayoría de 350 a 450. La membrana citoplasmática se identifica claramente separando una célula de otra. El retículo endoplásmico generalmente se presenta bien desarrollado formando sacos organizados en estructuras paralelas. Las

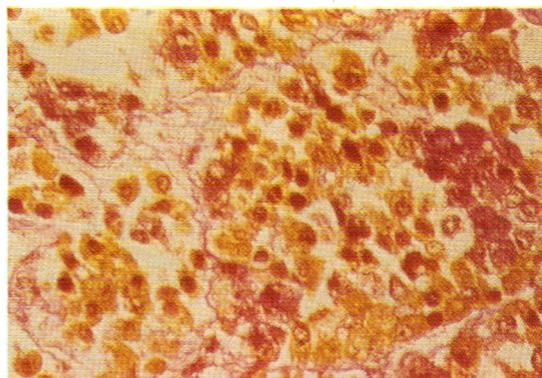


Figura 2. Reacción de coloración naranja G en células de la adenohipófisis humana. Las células teñidas de color naranja-amarillo corresponden a células acidófilas productoras de hormona de crecimiento. Las células eritrosinófilas son células productoras de prolactina. (400 X).

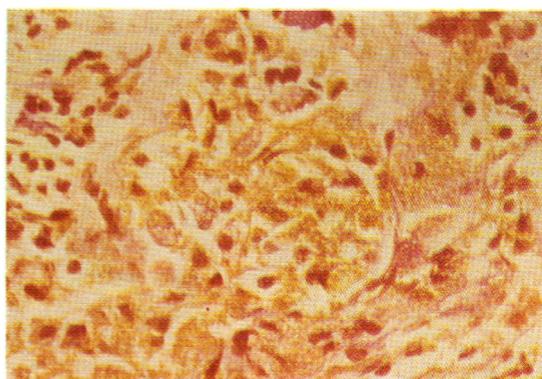


Figura 3. Reacción de coloración naranja G en un adenoma hipofisiario de tipo acidófilo. Nótese que la mayoría de las células aparecen teñidas de color naranja-amarillo. (400 X).

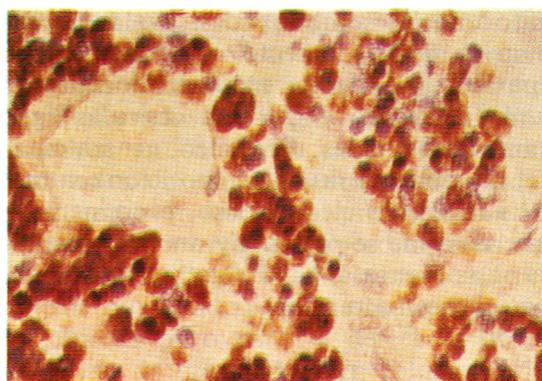


Figura 4. Reacción positiva de peroxidasa anti-peroxidasa en células productoras de hormona de crecimiento en la adenohipófisis humana. La reacción positiva se distingue por un fuerte precipitado color café depositado en el citoplasma celular. Nótese que la mayoría de las células se encuentran alineadas alrededor de capilares además presentan bordes redondos y forma ovoide. (400 X).

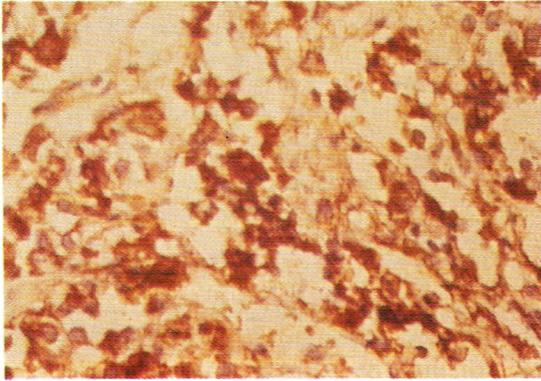


Figura 5. Reacción de peroxidasa anti-peroxidasa fuertemente positiva en un adenoma hipofisiario de tipo acidófilo, hallazgo patológico en un caso de acromegalia. (400 X).

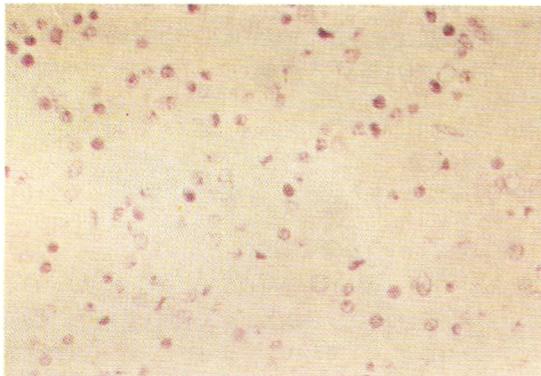


Figura 6. Reacción de peroxidasa anti-peroxidasa negativa en células de la adenohipófisis humana cuando éstas son expuestas al suero anti-hormona de crecimiento previamente adsorbido con hormona de crecimiento. (400 X).

mitocondrias son alargadas, ovaladas con matriz moderadamente electrodensa. El aparato de Golgi se encuentra localizado junto al núcleo y presenta vesículas ligeramente dilatadas. El núcleo, generalmente, es esférico y situado en posición central. El nucléolo es electrodensa, prominente y la cromatina se presenta granular y dispersa. Las Figuras 8A, 8B ilustran los hallazgos ultraestructurales.

DISCUSION

Contribución de la inmunocitoquímica a los estudios morfológicos de la adenohipófisis. Los procedimientos inmunocitoquímicos han añadido otra dimensión a

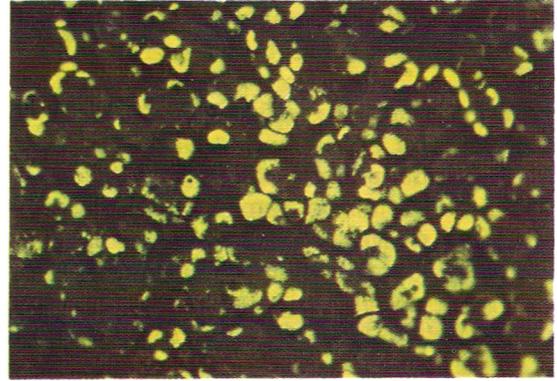
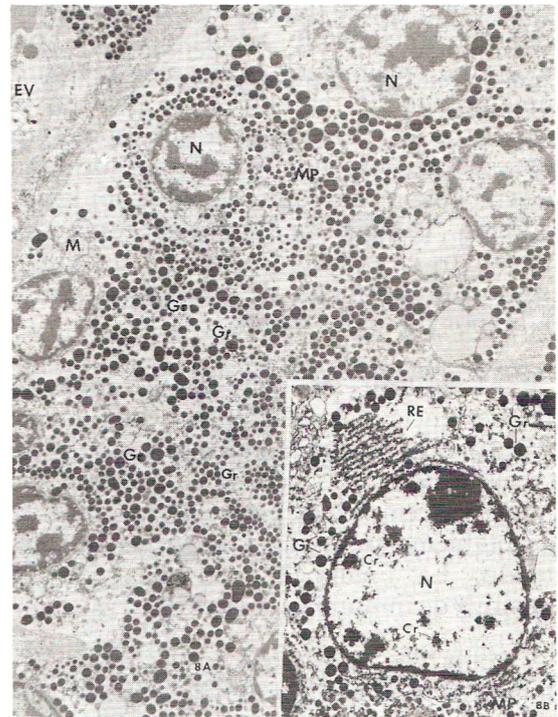


Figura 7. Reacción positiva en la detección de hormona de crecimiento humana en células de la adenohipófisis, mediante el método de inmunofluorescencia indirecta aplicado a tejidos en parafina. (400 X).



Figuras 8A y 8B. A. Adenohipófisis humana normal. Se observan varias células productoras de hormona del crecimiento con numerosos gránulos (Gr) donde se almacena la hormona antes de ser secretada al exterior. Nótese la estrecha relación de estas células con el endotelio vascular (EV), donde usualmente se vierte la hormona. (6.250 X).

B. Detalle de una célula productora de hormona del crecimiento. Nótese su núcleo en posición central (N), con nucléolo prominente (Nuc). La cromatina se presenta granular y dispersa (Cr). El retículo endoplasmico es bien desarrollado (RE). Los gránulos secretorios son evidentes (Gr) y presentan un diámetro promedio de 350-450 nanómetros. (11.250 X).

la histología. Han contribuido dinámicamente a entender las ciencias morfológicas en términos fisiológicos y bioquímicos y han contribuido incluso a estudiar la bioquímica de una célula individual en un tejido que contiene varios tipos de células, tratando de conservar la estructura celular. Los beneficios del procedimiento de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP), al mejorar la sensibilidad sin deteriorar la especificidad en la detección de antígenos o compuestos biológicos presentes en las células, ha permitido estudiar las células de la adenohipófisis en la relación estructura-ultraestructura-función y ha aportado nuevos criterios para entender la taxonomía clásica de las células de la pituitaria anterior (16).

No podemos dejar de mencionar el gran aporte en el desarrollo de procedimientos de diagnóstico más precisos. Particularmente en lo que se refiere a caracterizar tumores adenohipofisarios. Por este procedimiento hemos podido diferenciar los tumores hipofisarios por el tipo de hormona implicado, hasta el punto de poder catalogarlos como tumores puros o tumores mixtos dependiendo del producto comprometido. Nos podemos referir a prolactinomas puros en el caso de que sea la hormona prolactina la única involucrada en la neoplasia.

Otra gran contribución en el diagnóstico de tumores hipofisarios ha sido la aplicación del método PAP para la detección de células de la pituitaria, presentes en metástasis a distancia de un tipo de adenoma en particular (17).

Por el procedimiento de PAP hemos podido confirmar que en la adenohipófisis humana, esencialmente, las células que producen la hormona del crecimiento (GH) son una proporción considerable de las células acidófilas descritas en la clasificación de Romeis. Pudimos también confirmar, correlativamente, que todas las células cuyo citoplasma se reveló como

acidófilo naranja por la coloración de eritrosina-naranja G, corresponden a células productoras de la hormona (GH) por el método PAP. Esta observación está de acuerdo a lo citado por otros autores (18,19). Células con reacción eritrosinofílica al utilizar la coloración naranja G, corresponden a células productoras de hormona prolactina, detectadas por el método PAP (20). Estas observaciones verifican el concepto de que la hormona del crecimiento y la prolactina están contenidas y son secretadas por dos poblaciones diferentes de células acidófilas en la adenohipófisis humana.

El citoplasma de las células productoras de hormona del crecimiento (GH) se tiñe difusamente por el método PAP, pero depósitos de peroxidasa más intensos fueron localizados en algunos sectores del citoplasma celular sugiriendo acúmulos o concentración de gránulos. La reacción de coloración PAP en los gránulos se puede asociar como una indicación de que éstos representan una forma de almacenamiento de la hormona; mientras que la reacción difusa sugiere que el método inmunocitoquímico es capaz de revelar la presencia citoplasmática de la hormona, aun cuando ésta no se encuentre empacada en forma de gránulo.

Anticuerpos inespecíficos fueron removidos del suero anti-hormona de crecimiento mediante la adsorción del mismo con macerados de hígado de ratón. Anticuerpos anti-hormona prolactina fueron removidos de éste mediante adsorción del antisuero con hormona prolactina. Utilizando los anteriores procedimientos de adsorción pudimos estar seguros de que el antisuero utilizado en este estudio era completamente puro para la detección de la hormona de crecimiento en células de la adenohipófisis. La negatividad de la reacción PAP utilizando suero anti-hormona de crecimiento adsorbido con hormona de crecimiento humana comprobó la monoespecificidad del antisuero utilizado.

El método de inmunofluorescencia indirecta en tejidos en parafina, permite también detectar eficientemente las células que producen hormona de crecimiento en la adenohipófisis humana. Este procedimiento, al igual que el método PAP, permite el análisis retrospectivo de tejidos embebidos en parafina. Sin embargo, tiene la desventaja de ser menos sensible para detectar concentraciones bajas de antígenos en los tejidos; utiliza diluciones bajas de los antisueros, incrementándose el costo de la investigación; utiliza un equipo de microscopía costoso no siempre disponible en muchos laboratorios y las preparaciones no son de carácter permanente.

La identificación de los diferentes tipos de células de la adenohipófisis mediante el microscopio electrónico adolece de precisión cuando se utilizan métodos de rutina. Solamente se obtiene cierto grado de certeza cuando se compara con preparaciones gruesas estudiadas por microscopía de luz. Las técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía electrónica han contribuido a la identificación específica de las células de la adenohipófisis (21). Los estudios de rutina permiten dar una orientación relacionada con el grado de actividad celular. Sin embargo, se anota que el material obtenido post-mortem presenta cambios ultraestructurales de degeneración celular (22-24).

Mecanismos de acción de la hormona de crecimiento. La secreción de la hormona de crecimiento está controlada por el hipotálamo, mediante la acción de un factor liberador de la hormona (GH-LF) y un factor inhibidor (GH-IF). Las lesiones hipotalámicas o la sección del tallo hipotalámico inhiben la secreción de la hormona (25). La Figura 9 ilustra el mecanismo de acción de la hormona de crecimiento (GH). La hormona es metabolizada con rapidez en el hígado, la vida media de la hormona circulante es de 30 minutos y la secreción diaria es de 4 mg/día en el adulto. La GH actúa retroactivamente para inhibir

su propia secreción; los niveles elevados de la hormona en el plasma reducen la secreción pituitaria de la misma. La secreción también puede ser inhibida por el cortisol, ácidos grasos y la medroxiprogesterona (26).

Los niveles plasmáticos de la hormona de crecimiento son medidos por inmunoensayo. El nivel basal de la hormona en adultos es de 3 nanogramos/mililitro, pero se eleva en respuesta a una variedad de estímulos tales como: hipoglicemia, incremento en los niveles circulantes de ciertos aminoácidos, sobrecarga psíquica, pirógenos y L-Dopa. Los valores en los recién nacidos son más altos, pero los niveles de la hormona en el resto de la niñez no son significativamente mayores que los encontrados durante la vida adulta. Existen grandes cantidades de hormona de crecimiento en pituitarias de adultos. En términos de la fisiología del crecimiento, dichas cantidades podrían correlacionarse con el crecimiento en la vida adulta (27).

El número de células productoras de hormona del crecimiento fue cuantificado en los casos estudiados en el presente trabajo. Se observó un mayor número de células en las pituitarias de origen masculino, en forma similar a lo encontrado por otros autores (10), en animales de experimentación. Desde luego, no es posible concluir definitivamente las diferencias en el número de células con producción de hormona de crecimiento en relación al sexo y se requiere un estudio con mayor número de casos a fin de establecer si la diferencia es significativa.

En condiciones patológicas se ha demostrado (8) una correlación entre niveles altos de la hormona de crecimiento detectado por radioinmunoensayo en el suero de pacientes con acromegalia y el número de células con reacción positiva detectada por el método PAP en adenomas hipofisarios de los casos correspondientes. Concentraciones altas de la hormona de crecimen-

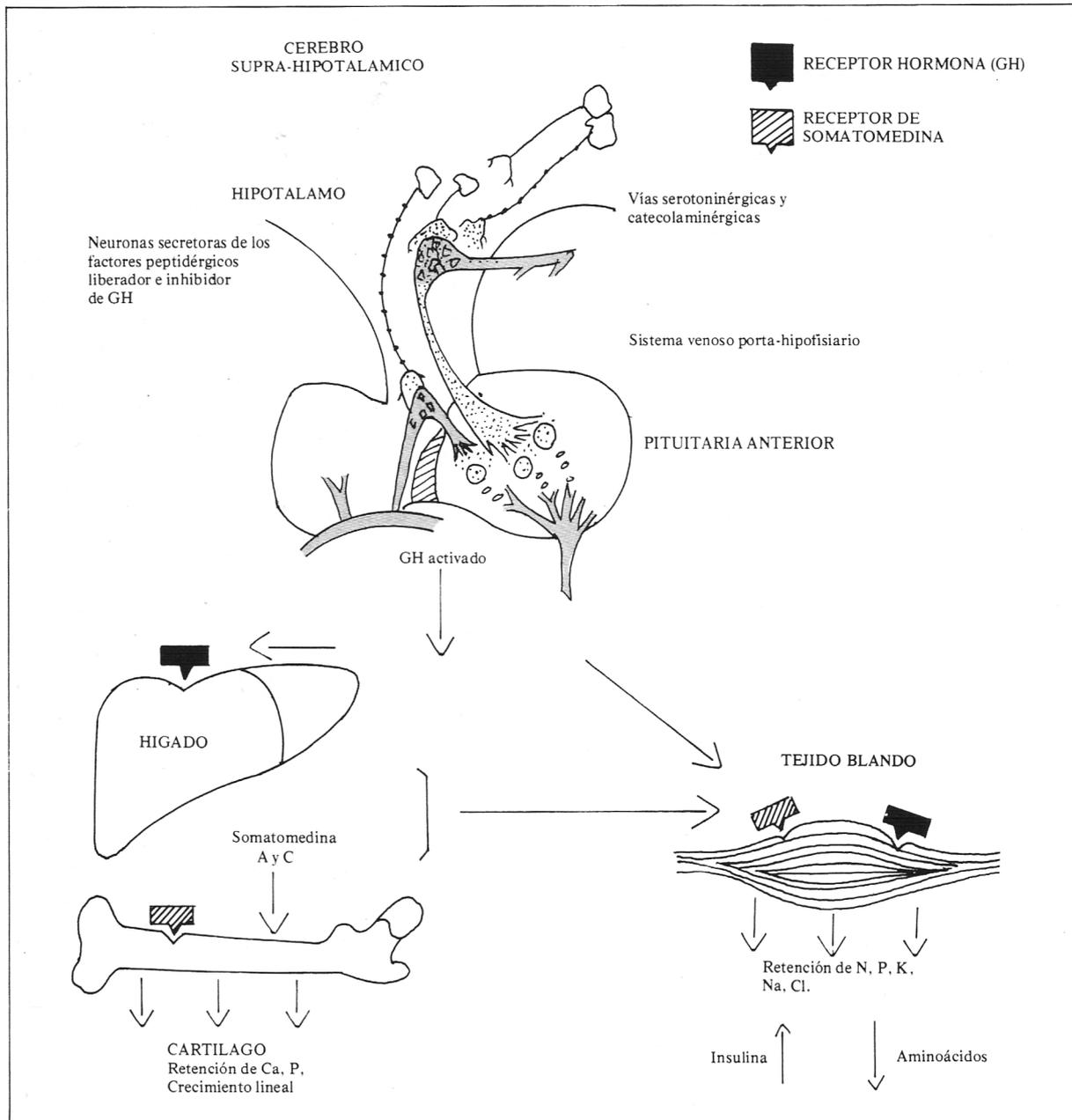


Figura 9. Mecanismos de acción de la hormona de crecimiento a nivel de tejido blando y hueso.

to (27 a 279 ng/ml) en el suero de dichos pacientes correspondieron a reacciones PAP marcadamente positivas en los adenomas hipofisarios. En el presente estudio se observó una reacción PAP fuertemente positiva para la hormona del crecimiento en células de la adenohipófisis

en el caso de acromegalia. Este tipo de reacciones positivas sugieren una alta concentración de la hormona a nivel celular.

Perspectivas de investigación de la hormona de crecimiento y su aplicación en los humanos. Se pensó que los niños deficientes

tes en hormona del crecimiento sólo podrían ser ayudados en su crecimiento por la aplicación de la hormona obtenida de pituitarias de cadáveres lo cuál hacía su uso altamente limitado. Sin embargo, dos recientes hallazgos de la biomedicina han mejorado considerablemente las perspectivas de esta situación: el hecho de que la hormona humana del crecimiento (hGH) estimula el crecimiento en niños con deficiencia de la hormona y la reciente producción de la hormona biológicamente activa mediante la tecnología del DNA recombinante.

Rudman (28) ha informado que el tratamiento con hormona de crecimiento sintética en niños de poca estatura que padecen de artritis reumatoide juvenil,

permite una rápida reparación de sus heridas, huesos y cartílagos. Así mismo, en un estudio de casos y controles, Rudman y sus asociados (29) han demostrado un significativo incremento del crecimiento (4 pulgadas por año) en jóvenes considerados como variantes normales de corta estatura (NVSS), los cuales, según estadísticas, constituyen el 40% de 1.800.000 jóvenes considerados como de corta estatura en los Estados Unidos. Estos niños fueron tratados con dosis exógenas convencionales (2 unidades) de hormona del crecimiento tres veces por semana durante un período de 4 a 24 meses. Con este tipo de tratamiento la rata de crecimiento por año resultó ser de 2,15 centímetros a 8,3 centímetros. Estos estudios han permitido hacer conclusiones acerca de los beneficios del tratamiento en

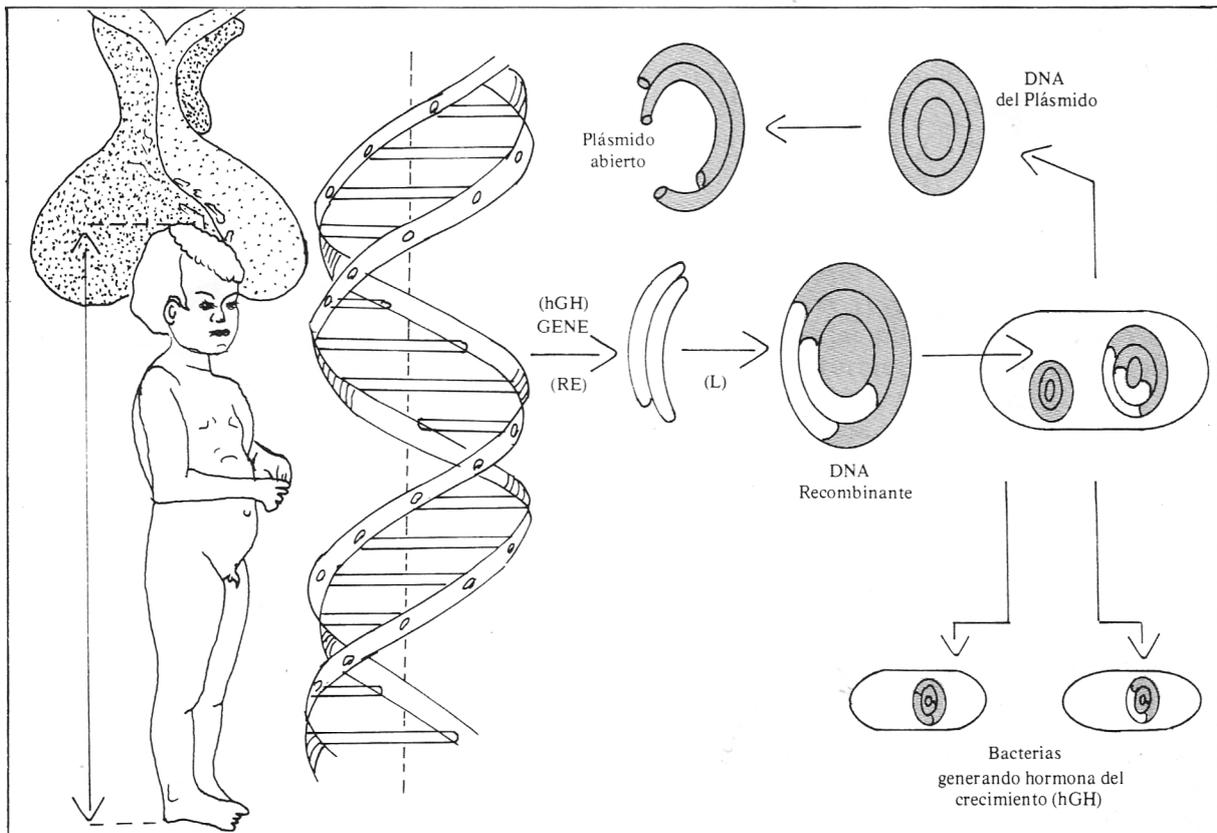


Figura 10. Producción de la hormona de crecimiento (hGH) mediante la técnica de recombinación del DNA. El gene de la hormona de crecimiento (hGH) es obtenido a partir de DNA mediante la acción de endonucleasas de restricción (RE) específicas para ser luego insertado en el plásmido abierto y ligado a él por la acción de ligasas (L) específicas. El plásmido es introducido en la bacteria *E. coli*, donde se replicará junto con el DNA bacteriano. El mensaje genético en forma de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) generado en la bacteria lleva ahora la información para su traducción en proteínas, a nivel de los ribosomas bacterianos; generando entonces la producción de hormona del crecimiento (hGH).

este tipo de individuos (NVSS) y desde luego originan una serie de interrogantes acerca de la naturaleza y mecánica funcional de su hormona de crecimiento endógena.

Desde un punto de vista práctico el uso de la hormona del crecimiento humana (hGH) es todavía muy restringido debido a las dificultades en su obtención como mencionamos anteriormente. Sin embargo, la moderna tecnología de recombinación del DNA, ahora tan popularizada por la biología molecular, ha permitido solucionar en parte este problema (30). Un resumen gráfico de la producción de la hormona de crecimiento (hGH) mediante esta técnica es representada en la Figura 10.

No debemos perder de vista que el crecimiento es un proceso complejo que comprende no solamente la hormona de crecimiento (GH), sino también la somatomedina, la hormona tiroidea, los andrógenos y la insulina, así como también factores genéticos y nutricionales. La condición de baja estatura puede surgir de condiciones muy variadas, tales como enfermedades crónicas, deficiente nutrición y problemas psico-sociales. Por lo tanto, se requiere una muy seria y exhaustiva investigación de los pacientes en los cuales este tratamiento puede estar indicado. Es conveniente estar alerta también sobre los posibles efectos secundarios que puede causar su administración.

SUMMARY

In order to verify the concept that growth hormone is contained in acidophilic cell populations, sections of formalin-fixed human adenohipophyses were stained immunocytochemically. For this purpose, the peroxidase anti-peroxidase (PAP) unlabeled antibody method was utilized. It was found that growth hormone producing cells, when revealed immunocytochemically, corresponded structurally to orange

acidophilic cells (orange stained) using the orange G procedure. Delineated clearly and specifically with the PAP technique, growth hormone cells were frequently seen aligned along side sinusoids. The ultrastructure of these cells is also presented and compared to these found by other authors. It is also described the useful application of this method to detect growth hormone in human pituitary adenomas and their metastases. Finally, it is discussed its role in growth, the research outlook, and its practical use for the treatment of some clinical entities and growth increase.

BIBLIOGRAFIA

- 1.— HALMK NS, MORKARTY GC. The Hypophysis. In: WEISS L, GREEP RO. *Histology*. 4 ed. New York: McGraw Hill Book Co.; 1977: 1035-1065.
- 2.— HALMI NS. The current status of pituitary cytophysiology. *NZ Med J* 1974; 80:551-556.
- 3.— ROMEIS B. Hypophyse. In: Von MOLLENDORFF W, ed. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Berlin: Springer-Verlag OHG; 1940: 6 (pt 3).
- 4.— KOVACS S, HORVATH E et al. Pituitary Chromophobe Adenomas consisting of Prolactin Cells. *Virchows Arch A Path A"nat"and"Histol* 1975;366: 113-123.
- 5.— BLOODWORTH JMB, HORVATH E et al. Fine structural pathology of the Endocrine System. In: TRUMP B, JONES RT. *Diagnostic Electron Microscopy*. New York: Wiley Medical; 1980; Vol. III: 359-527.
- 6.— RUMKE P, LADIGES NCJJ. Comparative immunochemical studies with antisera to sheep prolactin and bovine growth hormone on anterior pituitaries of ox, sheep, rats and mice. *Zellforsch* 1965; 67: 575-583.
- 7.— DACHEUX F, DUBOIS MP. Ultrastructural localization of prolactin, growth hormone and luteinizing hormone by immunocytochemical techniques in the bovine pituitary. *Cell Tissue Res* 1976; 174:245.
- 8.— FUKATA T, KAGEYAMA N et al. Morphofunctional study of pituitary adenomas with Acromegaly by Immunoperoxidase Technique and Electron Microscopy. *Cáncer* 1980; 45: 1598-1603.
- 9.— BURNS J. Background staining and sensitivity of the unlabeled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with peroxidase labeled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. *Histochemistry* 1975; 43: 291.
- 10.— BAKER BI, MIDGLEY AR et al. Differentiation of Growth Hormone and Prolactin containing Acidophils with Peroxidase labeled antibody. *Anat"Rec"*1969; 164: 163-172.
- 11.— STERNBERGER LA, HARDY PH Jr. et al. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. *Pre-*

- paration and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970; 18:315.
- 12.— HANSSEN H. ESCOVAR G. Detección de las infecciones por rotavirus mediante el método inmunocitoquímico de peroxidasa-antiperoxidasa. *Acta Med Col* 1980; 4: 465-472.
- 13.— QUALMAN SJ, KEREN DF. Immunofluorescence of deparaffinized Trypsin-treated Renal Tissues. *Lab Invest* 1979; 6: 483-489.
- 366 GLEN JS. BENNET P. Rapid Method of Preparing Tissue for Light and Electron Microscopy. *J Histochem Cytochem* 1968; 16: 815.
- 376 NEWCOMB EH. Polysciences Inc. Data Sheet 1970; N° 128.
- 16.— PARSONS JA. ERLANDSEN SL. Ultrastructural Immunocytochemical localization of prolactin in rat anterior pituitary by use of the unlabeled antibody enzyme method. *J Histochem Cytochem* 1974; 5: 340-354.
- 17.— LANDOLT AM. Pituitary Adenomas. Clinico-Morphologic Correlations. *J Histochem Cytochem* 1979; 10: 1395.
- 18.— FOWLER MR. MCKEEL DW. Human Adenohypophyseal Quantitative Histochemical Cell Classification. I. Morphologic Criteria and Cell Type distribution. *Arch Pathol Lab Med* 1979; 103:613-620.
- 19.— HALMI NS. Immunostaining of Growth Hormone and Prolactin in paraffin-embedded and stored or previously stained materials. *J Histochem Cytochem* 1978; 7: 486-495.
- 20.— ESCOVAR G, HANSSEN H. URIBE BOTERO G. Estudio Inmunocitoquímico de las hormonas de la adenohipófisis humana. II. Hormona Prolactina. (Material en preparación).
- 21.— DUELLO TM. HALMI NS. Ultrastructural-Immunocytochemical localization of Growth Hormone and Prolactin in Human Pituitaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 2: 189-196.
- 22.— Von LAWZIWITSCH I, DICKMANN GH et al. Cytological and ultrastructural characterization of the Human Pituitary. *Acta Anat* 1972; 81: 286-316.
- 23.— LANDOLT AM. ROTHENBUHLER V. The size of Growth Hormone granules in pituitary adenomas producing acromegaly. *Acta Endocrinol* 1977; 84: 461-469.
- 24.— GRAY AB. Analysis of diameters of human pituitary hormone secretory granules. *Acta Endocrinol* 1977; 85: 249-255.
- 25.— KING JC. GERRALL AA et al. Growth Hormone release inhibiting hormone pathway of the rat hypothalamus revealed by unlabeled-antibody peroxidase-antiperoxidase method. *Cell Tissue Res* 1975; 160: 423.
- 26.— BAKER BL. Functional Cytology of the Hypophysial Pars Distalis and Pars Intermedia. In: Greep RO. and Astwood EB, eds. *Handbook of Physiology*. Washington D.C.: American Physiological Society; 1974: 45-80.
- 27.— CALDERON LR. KOVACS L. Human Pituitary Growth Hormone cells in old age. *Gerontology* 1978; 6: 441-447.
- 28.— RUDMAN D. KUTNER MM et al. Normal variant short stature: subclassification based on response to exogenous human growth hormone. *J Clin Endocr Metab* 1979; 49: 92-99.
- 29.— SHINER G. Human Growth Hormone: Potentials for treatment are broadened. *Research Resources Reporter* 1980; 12: 1-5.
- 30.— BAXTER JD. MARTIAL JA et al. Human Growth Hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* 1979; 205: 602-607.
- 31.— Li CH. DIXON JS. Human pituitary growth hormone 32: The primary structure of the hormone: revisión. *Arch Biochem Biophys* 1971; 146: 233-236.