

ADENOMAS DA HIPÓFISE

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DE 167 CASOS

LÍGIA M. BARBOSA-COUTINHO* — A. C. M. ANTUNES** — N. A. AZAMBUJA**
G. R. GEYER*** — J. L. GROSS**** — N. P. FERREIRA** — N. M. M. LOPES**
C. L. REICHEL*** — C. G. ZETTLER***

RESUMO — Foram analisados 167 casos de adenomas da hipófise pelo método imuno-histoquímico utilizando o Complexo da Avidina Biotina (ABC) descrito por Hsu e col. (1981). Foram usados 6 anti-hormônios hipofisários: anti-prolactina (aPRL), na diluição de 1:1.500, anti-hormônio do crescimento (aHGH), na diluição de 1:4.000, anti-hormônio adrenocorticotrófico (aACTH), na diluição de 1:3.000, anti-hormônio tireotrófico (aTSH), na diluição de 1:3.000, anti-hormônio luteinizante (aLH), na diluição de 1:1.000, anti-hormônio foliculo estimulante (aFSH), na diluição de 1:300. O período de incubação foi de 14 a 16 horas a 4°C. Foi realizada também a coloração pelo Orange G-PAS. O levantamento dos dados clínicos, laboratoriais, e radiológicos dos casos de adenomas da hipófise foi realizado após a leitura das lâminas pelo método imuno-histoquímico. Dos 167 casos de adenomas da hipófise, 136 (81,4%) mostraram imuno-reação positiva a um ou mais anti-hormônios, variando o índice de positividade entre 1 e 90% das células neoplásicas. A imuno-reação foi positiva exclusivamente a um anti-hormônio em 80 casos (58,8%) e para dois ou mais anti-hormônios nos 56 casos restantes (41,2%), sendo a associação mais freqüentemente encontrada aquela em que a positividade ocorreu para o aPRL e o aHGH. A positividade à reação imuno-histoquímica distribuiu-se da seguinte forma: 100 casos foram positivos para o aPRL, em 49 pacientes de forma isolada; 65 casos foram positivos para o aHGH, em 22 pacientes de forma isolada; 31 casos foram positivos para o aACTH, em 8 pacientes de forma isolada; 5 casos foram positivos ao aTSH, em um paciente de forma isolada; um paciente apresentou adenoma positivo ao aLH; um caso foi positivo ao aFSH.

Pituitary adenomas: immunohistochemical study of 167 cases.

SUMMARY — One hundred and sixty seven cases of pituitary adenoma were analysed using the immunocytochemical method of the Avidin-Biotin Complex (ABC), described by Hsu et al. (1981). Six pituitary anti-hormones were utilized: anti-prolactin (aPRL) at a 1:1,500 dilution; anti-growth hormone (aHGH) at a 1:4,000 dilution; anti-adrenocorticotrophic hormone (aACTH) at a 1:3,000 dilution; anti-thyrotrophic hormone (aTSH) at a 1:3,000 dilution; anti-luteinizing hormone (aLH) at a 1:1,000 dilution; and a anti-follicle-stimulating hormone (aFSH) at a 1:300 dilution. Incubation period was 14 to 16 hours at 4°C. The survey of clinical, laboratory and radiological data of cases of pituitary adenomas was performed after reading the stained slides using the immunocytochemical method. Of the 167 cases of pituitary adenomas, 136 (81,4%) disclosed a positive immunoreaction to one or more anti-hormones, and the positivity index of neoplastic cells varied from 1 to 90%. The immunoreaction was positive exclusively to one anti-hormone in 80

Trabalho realizado no Departamento de Patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre; parte de Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina (Clínica Médica) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); financiado pelo CNPq (Processo 405986/85): * Professora Adjunta, Pesquisadora do CNPq e Doutora em Medicina pela UFRGS; ** Neurocirurgião; *** Patologista; **** Professor Titular em Medicina Interna da UFRGS, Coordenador do Curso e Orientador.

cases (58,8%) and to two or more anti-hormones in 56 cases, and the association most frequently found was between both aPRL and aHGH. The positivity to the immunoreaction was distributed as follows; — 100 cases were positive for aPRL, exclusively in 49 cases; — 65 cases were positive for aHGH, exclusively in 22 cases; — 31 cases were positive for aACTH, exclusively in 8 cases; — 5 cases were positive for aTSH, exclusively in one case; — one patient presented an adenoma positive to aLH and another patient to aFSH.

Em nenhum outro grupo de tumores intracranianos observaram-se modificações tão grandes na classificação e um progresso tão importante na identificação de sua natureza, como nos adenomas da hipófise. Essas neoplasias podem ser classificadas de várias formas, a primeira conforme o tamanho do tumor em macro e micro-adenomas. Se considerarmos o quadro clínico, os adenomas podem ser clinicamente 'mudos' ou apresentarem quadro clínico de secreção hormonal. Pode-se ainda classificar esses tumores conforme a capacidade tintorial de suas células neoplásicas em adenomas acidófilos, cromófbos e mucóides¹⁹. Quanto ao aspecto morfológico, os adenomas hipofisários apresentam modificações que se baseiam no grau de diferenciação, secreção hormonal e afinidade tintorial. Assim, Saeger e Luedecke²⁰ classificaram os adenomas da hipófise em: acidófilos (altamente diferenciado produtor de prolactina, altamente diferenciado produtor de hormônio do crescimento e os indiferenciados), de células mucóides (altamente diferenciado produtor de ACTH, altamente diferenciado produtor de TSH e indiferenciado) e cromófbos (de pequenas células, de grandes células e oncócito). Van Oordt¹⁷ sugeriu que tanto as células da hipófise anterior como os adenomas da hipófise fossem denominados conforme o tipo de hormônio por eles produzido. Isto foi seguido por Kovacs e col.¹⁰ que distinguiram 15 diferentes tipos de adenomas. O avanço tecnológico não permite que se estabeleça, na atualidade, um diagnóstico de adenoma da hipófise baseado apenas no estudo histopatológico de rotina. Desta forma a utilização do método imuno-histoquímico no estudo dessas neoplasias permite o diagnóstico, não só de um tumor secretante ou não, mas permite também que possamos identificar qual ou quais os hormônios hipofisários que estão sendo secretados pela neoplasia.

Este estudo tem por objetivo, pois, diagnosticar os adenomas da hipófise quanto à presença ou não de secreção hormonal, identificando qual o hormônio produzido pelos adenomas funcionantes e identificar a neoplasia produtora de mais de um hormônio.

MATERIAL E METODOS

De um total de 243 casos de adenomas da hipófise, obtidos por cirurgia trans-esfenoidal ou intracraniana, encontrados nos serviços de Patologia de Porto Alegre, no período compreendido entre janeiro de 1968 e dezembro de 1987, foram descartados 76 casos, por apresentarem escasso material para que fossem realizados novos cortes para estudo imuno-histoquímico. Desta forma restaram 167 casos que foram estudados pelo método imuno-histoquímico. Os tecidos provenientes dos adenomas da hipófise, fixados em formalina a 10% e incluídos em blocos de parafina, foram seccionados na espessura de 5 micra e montados em lâminas de vidro albuminizadas, totalizando 10 cortes seqüenciais de cada bloco, em lâminas separadas. Após a secagem em estufa a 35°C por 12 a 24 horas, os cortes foram mantidos à temperatura ambiente até serem submetidos aos procedimentos imuno-histoquímicos.

Utilizou-se a técnica da Avidina-Biotina (ABC) descrita por Hsu e col. (7), por ser mais sensível e permitir maior diluição dos anticorpos primários. Os anticorpos anti-prolactina, anti-hormônio do crescimento, anti-hormônio adrenocorticotrófico e o anti-hormônio tireotrófico foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. José Gilberto Vieira, da Escola Paulista de Medicina, nas diluições de 1:1500, 1:4000, 1:3000 e 1:3000; respectivamente. O anticorpo anti-hormônio luteinizante (Dako Co.) foi utilizado na diluição de 1:1000 e o anti-hormônio folículo-estimulante, na diluição de 1:300.

RESULTADOS

Do total de 167 casos de adenomas da hipófise estudados pelo método imuno-histoquímico, 91 pertenciam ao sexo feminino e 76 ao sexo masculino. O paciente mais jovem tinha 15 anos e o mais velho 74, tendo a média das idades sido 38 anos.

A reação imuno-histoquímica mostrou-se positiva em 136 casos (81,4%) e negativa em 31 casos (18,6%). A imuno-reação foi positiva a apenas um dos anti-hormônios em 30 casos e a dois ou mais anti-hormônios em 56 casos, sendo a associação mais freqüentemente encontrada entre a positividade ao anticorpo anti-prolactina e anti-hormônio do crescimento, que ocorreu em 29 pacientes (51%). A positividade à imuno-reação esteve assim distribuída (Tabela 1):

	PRL	HGH	ACTH	TSH	FSH	LH
PRL	49	—	—	—	—	—
HGH	29	22	—	—	—	—
ACTH	10	4	8	—	—	—
TSH	1	—	—	1	—	—
FSH	—	—	—	—	—	—
LH	—	—	—	—	—	—
HGH + ACTH	7	—	—	—	—	—
HGH + TSH	2	—	—	—	—	—
ACTH + FSH	2	—	—	—	—	—
TSH + LH	—	1	—	—	—	—

Tabela 1 — Distribuição da frequência dos adenomas hipofisários de acordo com a imuno-reatividade positiva.

- 100 pacientes tiveram imuno-reação positiva ao anticorpo anti-prolactina, de forma isolada em 49 casos e associada em 51 pacientes;
- 65 pacientes tiveram imuno-reação positiva ao anticorpo anti-hormônio do crescimento, em 22 casos de forma isolada e em 43 associados à positividade a outros anti-hormônios;
- 31 casos mostraram imuno-histoquímica positiva ao anticorpo anti-hormônio adrenocorticotrófico, de forma isolada em 8 pacientes e associada nos 23 casos restantes;
- 5 casos tiveram imuno-reação positiva ao anticorpo anti-hormônio tireotrófico, isolada em um caso e associada nos 4 casos restantes;
- um paciente teve imuno-histoquímica positiva ao hormônio foliculo-estimulante, associada a positividade a outros anti-hormônios;
- um paciente teve positividade imuno-reativa ao anti-corpo anti-hormônio luteinizante, também associada a outros anti-soros hipofisários.

Os adenomas da hipófise foram classificados, conforme sua afinidade tintorial pela coloração com o Orange G e PAS, em acidófilos, basófilos, cromófilos e mistos. Conforme pode ser visto na tabela 2, o adenoma cromófilo foi o mais freqüentemente encontrado.

	crom	eosin	basof	misto	total	%
PRL	24	5	0	20	49	29,3
HGH	14	3	0	5	22	13,1
ACTH	5	0	2	1	8	4,8
TSH	1	0	0	0	1	0,6
PRL + HGH	14	7	0	8	29	17,3
PRL + ACTH	8	0	1	1	10	6,0
HGH + ACTH	1	3	0	0	4	2,4
PRL + TSH	1	0	0	0	1	0,6
PRL + HGH + ACTH	3	3	1	0	7	4,2
PRL + ACTH + FSH	1	0	0	1	2	1,2
PRL + HGH + TSH	1	1	0	0	2	1,2
HGH + TSH + LH	0	0	0	1	1	0,6
Negativos	27	3	0	1	31	18,5
Total	100	25	4	38	167	100,0
%	59,8	14,9	2,4	22,7	100	

Tabela 2 — Distribuição dos diversos tipos de adenomas conforme a sua positividade aos diversos anti-hormônios hipofisários.

COMENTÁRIOS

Os adenomas da hipófise são encontrados em frequência de 10% em relação às demais neoplasias intracranianas submetidas a tratamento cirúrgico²³, podendo ser de até 27% se considerarmos a incidência em autópsias não selecionadas^{2,13}. Observa-se grande variabilidade quanto à idade de aparecimento dessas neoplasias, podendo ser encontrada em crianças de 2 anos a pessoas de 86 anos de idade, mas sua maior frequência ocorre na 5ª e 6ª décadas da vida^{3,13,23}. Nos casos aqui estudados, as idades oscilaram de 15 a 74 anos, com predomínio na 4ª década da vida. A frequência dos adenomas da hipófise é igual em ambos os sexos^{2,3,23}, com ligeiro predomínio dos homens (1:0,7) na série de McComb e col.¹³. Em tumores experimentais em ratos, os adenomas foram mais frequentes em fêmeas^{14,15}. No trabalho ora em estudo, os adenomas apresentaram ligeiro predomínio em mulheres (1,2:1,0).

Quando os adenomas da hipófise eram originariamente classificados morfológicamente, pelos achados de microscopia óptica e características histoquímicas das células neoplásicas, as conclusões sobre o funcionamento dessas células era puramente inferencial⁴. Desde que se tornou evidente que os adenomas classificados como cromóforos apresentavam expressão clínica de secreção hormonal, admitiu-se que a classificação dessas neoplasias era mais complexa que a simples análise histoquímica o perititia. Por esta razão, muitos trabalhos^{14,15} foram realizados utilizando a microscopia eletrônica (ME), tendo sido encontrados grânulos de secreção no interior do citoplasma dessas células. Entretanto, esta técnica esbarrava em novo aspecto, ou seja, se realmente o tumor era secretante, qual o hormônio que estava presente nesses grânulos? A análise do tamanho dos grânulos permitia inferência sobre o tipo de hormônio produzido, que só a correlação clínica poderia corroborar.

O adenoma da hipófise mais frequentemente encontrado foi o cromóforo que, em 27% dos casos, mostrou-se não funcionante e, nos demais casos, mostrou imuno-reação positiva a um ou mais anti-hormônios. Como se vê, a grande maioria desses adenomas cromóforos apresenta atividade hormonal, não se podendo, portanto, correlacionar seu aspecto morfológico com sua atividade hormonal. O adenoma eosinófilo mostrou atividade hormonal tanto para a prolactina como para o hormônio do crescimento, tendo sido negativa a imuno-reação em três casos. Os adenomas basófilos representaram em todos os casos a presença de secreção de ACTH, embora nem sempre o tumor secretante de ACTH se apresentasse como basófilo. Os adenomas mistos apresentaram secreção hormonal variável.

As diferentes estatísticas^{4,8,9,16,21} mostram que a percentagem de casos positivos à reação imuno-histoquímica varia de 65,3%¹⁶ a 86,3%⁶. Na série presentemente estudada, 81,4% dos casos de adenomas da hipófise apresentaram imuno-reação positiva, cuja distribuição pode ser vista na tabela 1. Pode-se observar que a reação positiva foi mais frequentemente encontrada para o anticorpo anti-prolactina, totalizando 100 casos (73,52%), dos quais 49 de forma isolada. Como se vê, o adenoma secretor mais comum é o que produz prolactina, fato confirmado tanto em estudos autópticos^{2,13} como em casos de cirurgia^{1,9,11,12,18,22}.

Da série de adenomas da hipófise estudada no presente trabalho, 44 casos (26,34%) apresentaram imuno-reação para dois anti-hormônios hipofisários, dos quais 29 (56%) estavam representados pela associação entre a prolactina e o hormônio do crescimento, restando apenas 15 casos para as demais associações hormonais. Os adenomas multi-hormonais, ou seja, aqueles secretantes de mais de dois hormônios, são muito raros, embora, após o advento da técnica imuno-histoquímica, tenham-se tornado cada vez mais frequentes⁵. Kujas e col.¹¹ encontraram esse tipo de adenoma em 10,3% de seus casos estudados por esta técnica. No presente trabalho, esses tumores perfizeram 7,2% do total dos casos estudados pela técnica imuno-histoquímica.

Também com o advento da técnica imuno-histoquímica, muitos adenomas considerados como não produtores de hormônios, pois não apresentavam expressão clínica dessa hipersecreção, mostraram possuir grânulos secretores no interior do citoplasma, contendo um ou mais hormônios.

Pelo exposto, concluímos que somente o exame imuno-histoquímico permitirá um diagnóstico definitivo e seguro acerca da secreção hormonal ou não por parte das células neoplásicas. Além disto, a técnica imuno-histoquímica aplicável aos espécimes cirúrgicos, permite análise retrospectiva do material, aumentando as informações sobre os tumores hipofisários humanos⁴. Assim, na classificação dos adenomas da hipófise não é mais permitida a utilização de uma nomenclatura baseada apenas nas propriedades tintoriais das células neoplásicas mas, sim, na qualidade da imuno-reação, associada à nomenclatura do tipo de hormônio evidenciado.

REFERÊNCIAS

1. Antunes JL, Housepien EM, Frantz AG, Holub DA, Hoi RM, Carmei PW, Quest DO — Prolactin secreting tumors. *Ann Neurol* 2:148, 1977.
2. Burrow GN, Wortzman G, Rewcastle NB, Holgate RC, Kovacs K — Microadenomas of the pituitary and abnormal sellar tomograms in a unselected autopsy series. *N Engl J Med* 304:156, 1981.
3. Costello RT — Subclinical adenoma of the pituitary gland. *Am J Path* 121:205, 1936.
4. Esiri MM, Adams CBT, Burke C, Underdown R — Pituitary adenomas: immunohistology and ultrastructural analysis of 118 tumors. *Acta Neuropath (Berlin)* 63:1, 1983.
5. Heitz PU — Multihormonal pituitary adenomas. *Horm Res* 10:1, 1979.
6. Heitz PU, Oberholtzer M, Zenkusen HR, Kasper M, Reubi JC, Gudat F, Landolt AM, Stähli C — Occurrence and pattern of cytokeratins in human pituitary adenomas. In Landolt AM, Heitz P, Zapf J, Girard J, Del Pozo E (eds): *Advances in Pituitary Adenoma Research. Advances in Biosciences, Vol 29*. Pergamon, Oxford, 1988.
7. Hsu SM, Raine L, Fanger H — A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Path* 75:734, 1981.
8. Jautzke G — Immunohistochemische Klassifizierung von operierten Hypophysenadenomen mit besonderer Berücksichtigung der subzellulären Hormonlokalization und der simulaten Produktion mehrerer Hormone. Tese (Livre Docência), Universidade Livre de Berlin. Berlin, 1985.
9. Kovacs K, Corenblum B, Sirek AMT, Penz G, Ezrin C — Localization of prolactin in chromofobe pituitary adenomas: study of human necropsy material by immunoperoxidase technique. *J Clin Path* 29:250, 1976.
10. Kovacs K, Horvath E, Ryan N, Ezrin C — Null cell adenoma of the human pituitary. *Virchows Arch A Path Anat* 387A:165, 1980.
11. Kujas M, Pleua-Varet J, Peillon F, Derome P — Correlation between immunocytochemical and clinical data in 675 cases of pituitary adenomas. In Landolt AM, Heitz P, Zapf J, Girard J, Del Pozo E (eds): *Advances in Pituitary Adenoma Research. Advances in Biosciences, Vol 69*. Pergamon, Oxford, 1988, pg 21.
12. Martinez AJ, Lee A, Moosy J, Maroon JC — Pituitary adenomas: clinico-pathological and immunohistochemical study. *Ann Neurol* 7:24, 1980.
13. McComb GJ, Kovacs K, Horvath E, Singer W, Killinger BW, Smith HSM, Ezrin C, Weiss MH — Correlative ultrastructural morphometry of human prolactin-producing adenomas. *Acta Neurochirurg* 53:217, 1980.
14. McComb DJ, Ryan N, Horvath E, Kovacs K — Subclinical adenomas of the human pituitary. *Ann Pathol Lab Med* 107:488, 1983.
15. Mennel HD — Zur Morphologie der Hypophysentumoren bei der Ratte. *Arzneimittelforsch* 19:1955, 1969.
16. Mennel HD, Bücheler J, Barbosa-Coutinho LM, Wechsler W, Zülch KJ — Morfologia dos tumores da hipófise em ratos. *Arq Neuro-Psiquiat (São Paulo)* 35:291, 1977.
17. Mukai K — Pituitary adenomas. *Cancer* 52:648, 1983.
18. van Oordt PGWJ — Nomenclature of the hormone-producing cells in the adenohypophysis. *Gen Comp Endocrinol* 5:131, 1965.
19. Riedel M, Noldus J, Saeger W, Lüdecke K — Sellar lesions associated with isolated hyperprolactinemia. *Acta Endocrinol* 113:196, 1986.
20. Roy S — Ultrastructure of pituitary adenomas with particular reference to chromophobe adenoma. *Progr Neuropath* 5:223, 1983.
21. Saeger W, Lüdecke D — Pituitary adenomas with hyperfunction of TSH: frequency, histological classification. *Virchows Arch A Path Anat* 394:255, 1982.
22. Saeger W — Die Hypophysenadenomen bei galactorrhoea. *Virchows Arch A Path Anat* 368:123, 1975.
23. Schatz H, Daun M, Leicht R, Stracke H, Saeger H, Saeger W, Zierski J — Immunohistochemical examination of pituitary adenomas. *Hormone Res* 21:246, 1985.
24. Zülch KJ — Tumors of the anterior pituitary. In Zülch KJ: *Brain Tumors: their Biology and Pathology*. Springer, Berlin, 1986, pg 461.