

PROFILUL IMUNOHISTICIMIC AL ADENOAMELOR HIPOFIZARE. CERTITUDINI ȘI CONTROVERSE

Eugen Melnic¹ – dr. în șt. med., conf. univ.,
Ecaterina Foca¹ – dr. în șt. med., conf. univ.,
¹Catedra Morfopatologie, IP USMF „Nicolae Testemițanu”

e-mail eugen.melnic@usmf.md

Rezumat

Tumorile hipofizare sunt procese patologice la nivelul hipofizei, sunt hormonal active, cu localizare la baza creierului. Hipofiza, deși are dimensiuni reduse, are un rol foarte important în reglarea metabolismului și participă la maturarea organismului în general. Tumorile hipofizare reprezintă 10-25% din totalitatea tumorilor cu localizare intracerebrală, au o rată de creștere foarte lentă și nu au capacitatea de a metastaza. În pofida faptului că sunt benigne din punct de vedere histologic au un efect biologic malign și din acest motiv necesită să fie calitativ diagnosticate. La ora actuală realizarea profilului imunohistochimic permite diagnosticarea funcției secretorii a tumorii și prescrierea tratamentului personalizat.

Cuvinte-cheie: adenom, hipofiză, profil imunohistochimic

Summary. Immunohistochemical profile of pituitary adenomas. Assurances and disputes

Pituitary tumors are hormonally active pituitary disease processes, localized at the base of the brain. Pituitary gland, although small, it has an important role in metabolism regulating and takes part in the maturation of body in general. Pituitary tumors represent 10-25% of all intracranial tumors, have a very slow growth rate does not have the ability to metastasize. Despite the fact that they are benign histologically they have a biological malignant effect and therefore need to be qualitatively diagnosed. Currently immunohistochemical profiling permits to diagnose the tumor secretory function and prescribe personalized treatment.

Key words: adenoma, pituitary gland, immunohistochemical profile

Резюме. Иммуногистохимический профиль аденомы гипофиза. Достоверность и дискуссии

Опухоли гипофиза – это гормонально активные патологические процессы, локализованы у основания головного мозга. Гипофиз, хотя и небольших, играет важную роль в регуляции обмена веществ и участвует в созревании организма в целом. Опухоли гипофиза представляют собой 10-25% всех внутричерепных опухолей, имеют очень медленный темп роста не обладают способностью к метастазированию. Несмотря на то, что они являются гистологически доброкачественными, но имеют злокачественный биологический эффект и, следовательно, должны быть качественно диагностированы. В настоящее время иммуногистохимическое профилирование дает возможность установить секреторную функцию опухоли и назначить персонализированное лечение.

Ключевые слова: аденома, гипофиз, иммуногистохимический профиль

Tumorile glandei hipofizare și a regiunii selare reprezintă aproximativ 10 – 15% din tumorile cerebrale. Numeroase tipuri de tumori pot implica regiunea selară, reflectând anatomia sa complexă. Cele mai frecvent întâlnite tumori sunt adenoamele hipofizare, tumori epiteliale benigne derivate din celulele adenohipofizei. De fapt, adenoamele hipofizare reprezintă a treia entitate tumorală în practica neurochirurgicală, fiind devansate doar de gliome și meningioame. Adenoamele hipofizare reprezintă aproximativ 75% din leziunile selare, afectează predominant femeile între decadele a treia și a șasea, cu toate acestea, nici un grup de vârstă nu este cruțat. Adenoamele sunt mai puțin frecvente la copii și adolescenți, dar majoritatea dintre aceste tumori dezvoltate în copilărie sunt clinic funcționale și pot fi mult mai agresive [2].

Adenoamele incidentale au fost descoperite în

aproape 10% din cazuri la pacienții autopsiați. O meta-analiza mai recentă, estimează o prevalență a adenoamelor hipofizare la 14,4% în studiile postmortem și de 22,2% în studiile radiologice [1]. Dintre aceste leziuni descoperite incidental, majoritatea nu prezintă impact clinic, fiind numite generic “incidentalome”. Aceste leziuni nu afectează funcția țesutului hipofizar normal și nici nu invadează structurile învecinate [3].

Comparativ, tumori primare ale neurohipofizei sunt rare și în general, sunt similare cu tumori primare ale sistemului nervos central. Neurohipofiza, cu toate acestea, este un loc comun pentru metastaze. Pe lângă tumori, o varietate de leziuni nonneoplastice pot afecta glanda pituitară, aducând o serie de procese în diagnosticul diferențial al tumorilor care implică această regiune.

De la epidemiologie la aspectele lor moleculare,

adenoamele hipofizare reprezintă un spectru larg de tulburări care pot fi analizate și clasificate în funcție de secreția hormonală, aspectele clinice și tratament, ținând cont însă și de aspectele histopatologice și de microscopie electronică. Datorită metodelor moderne de studiu celular (imunohistochimie, microscopie electronică, hibridizare in-situ), nu mai este folosită vechea clasificare tinctorială a adenoamelor, aceasta fiind lipsită de informații privind secreția hormonală și activitatea biologică a celulelor tumorale [4].

La fel ca în orice neoplazie, există perturbări ale controlului ciclului celular privind activarea oncogenelor sau pierderea heterozigoției genelor supresoare tumorale. În ultimii ani s-au realizat progrese remarcabile în studiul patogenezei moleculare a adenoamelor hipofizare. Celulele stem sunt o sursă continuă de reînnoire a testului hipofizar, precum și o posibilă sursă de proliferare monoclonală pe un micromediu și un teren genetic modificat [5].

O bună parte din aceste tumori sunt "silenzioase", subclinice, nefiind operate niciodată de neurochirurg, de aceea este foarte important să diferențiem incidențaloamele, care nu necesită tratament, de adenoamele hipofizare, care implică un diagnostic corect și o atitudine terapeutică, fie ea farmacologică, radioterapeutică sau chirurgicală [6].

În ciuda faptului că adenoamele sunt niște entități patologice benigne, ele pot deveni severe, chiar amenințătoare de viață, prin invazie locală și compresiune sau prin complicații metabolice și cardiovasculare.

Caracterizarea moleculară a adenoamelor hipofizare, extrem de necesară pentru identificarea factorilor cu un posibil impact prognostic și terapeutic este extrem de puțin studiată. Cu excepția adenoamelor hipofizare GH și PRL secretante care au fost extensiv studiate din punct de vedere molecular, celelalte tipuri relativ rare dar care prezintă o agresivitate ridicată comparativ cu precedentele, cu efecte nefavorabile asupra profilului endocrin al întregului organism nu au fost complet caracterizate din punct de vedere molecular.

Din aceste motive, prezenta lucrare și-a propus studiul factorilor moleculari cu rol predictiv și probabil terapeutic abordați dependent de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare și își dorește să puncteze corelațiile dintre diferiții factori moleculari studiați pentru realizarea unor subgrupe moleculare caracterizate de factori care ulterior ar putea fi utilizați ca markeri prognostici dar, mai ales, terapeutici. Totodată, prezenta lucrare conține date preliminare obținute pentru factori care nu au mai fost studiați până în prezent în adenoamele hipofizare cum ar fi VEGF165b, fracțiunea inhibitorie a VEGF sau puțin și sporadic studiați cum este EG VEGF.

Partea generală a lucrării de față se bazează pe datele din literatură și descrie în detaliu, aspecte de histologie ale glandei hipofize, insistând asupra polimorfismului celular, aspect important implicat în heterogenitatea profilului hormonal al adenoamelor hipofizare. Au fost descrise în detaliu toate tipurile celulare ale adenohipofizei, care reprezintă sursa variatelor tipuri de adenoame hipofizare. Aspectele histopatologice descrise au utilizat ca sursă cele mai noi clasificări în domeniu, pornind de la clasificarea WHO actuală. Nu au fost neglijate aspectele controversate din literatură privind formele anatomopatologice și tinctorialitatea celulelor care constituie adenoamele hipofizare. În ultimele două capitole ale părții generale au fost menționați factorii predictivi implicați în patogenia adenoamelor hipofizare, cu rol terapeutic și diagnostic. Datele din literatură menționate în aceste două capitole au relevat controversese multiple privind markerii prognostici și terapeutici care determină până în acest moment o lipsă a terapiei standardizate în adenoamele hipofizare. Datorită lipsei standardizării protocoalelor de evaluare și terapie pentru adenoamele hipofizare, rata de recurență a unor tipuri de adenoame hipofizare în special a celor secretante de prolactină.

Pe baza celor prezentate mai sus, prezenta lucrare a avut ca scop principal identificarea de noi factori cu rol prognostic și terapeutic prin studiul extensiv al factorilor de creștere puțin sau deloc studiați, cu posibilitatea de a stabili noi tendințe clinice diagnostice și terapeutice bazate pe aceste observații.

Partea specială se bazează pe datele cunoscute, controversate sau absente din literatură privind studiul adenoamelor hipofizare la nivel proteic și molecular. Chiar dacă cea mai mare parte a tezei de abilitare abordează aspectele proteice și moleculare, primele două capitole se referă la aspectele histopatologice, de pattern și de tinctorialitate a celulelor tumorale din adenoamele hipofizare. Chiar dacă în prezent aceste aspecte sunt utilizate în evaluarea primară a adenoamelor hipofizare dar nu mai reprezintă un element diagnostic de certitudine ci doar orientativ, în prezentul studiu sunt foarte multe date care susțin faptul că diagnosticul convențional nu trebuie neglijat. Totodată, diagnosticul histopatologic a evidențiat predominantă unor tipuri histopatologice particulare în zona Republicii Moldova, aspect care, pentru această zonă este important din punct de vedere epidemiologic, dat fiind faptul că, prezentul studiu este primul de acest gen din Republica Moldova și, în plus nu există date epidemiologice care să caracterizeze adenoamele hipofizare din această arie geografică. Importanța diagnosticului histopatologic reiese și din capitoul de concordanță morfologie imunohistochimie care

prezintă detalii semnificative privind corelația dintre pattern-ul de creștere și predominantă expresiei unuia sau mai multor hormoni hipofizari.

Imunoprofilul adenoamelor hipofizare, pas obligatoriu în evaluarea acestui tip de patologie hipofizară a constituit un capitol important al prezentei teze. Tipurile de adenoame hipofizare pure, par să aibă un profil imunohistochimic aparte în Republica Moldova prin predominanța adenoamelor hipofizare pure de LH secretante. Acest aspect deschide o nouă pistă de cercetare în domeniul adenoamelor hipofizare în această arie geografică, respectiv, cea a studiului adenoamelor non funcționale care se consideră că ar fi de fapt secretante inițial de FSH și LH. Mai mult, procentul de adenoame hipofizare plurihormonale a fost dublu în Republica Moldova comparativ cu alte zone geografice, aspect care este extrem de controversat la nivel internațional și nestudiat în zona geografică menționată. Adenoamele plurihormonale reprezintă un grup aparte, cu o etiologie și evoluție imprezvizibilă, pentru care nu există în acest moment o clasificare acceptată la nivel internațional.

Clasificarea histopatologică a adenoamelor hipofizare plurihormonale nu prezintă în acest moment criterii bine stabilite de încadrare a acestora în diferite subclase. Din aceste motive, observația privind procentul de adenoame hipofizare plurihormonale, deschide o nouă temă de cercetare și o provocare de a stabili criterii precise de încadrare clinică și terapeutică dependente de profilul hormonal. Două aspecte particulare au guvernat adenoamele plurihormonale din prezentul studiu: asocierea GH-PRL-ACTH diferită de asocierile uzuale ce conțin în majoritate TSH și doar pentru asocierile quadruple adiția de TSH. Asocierea profilului hormonal menționat cu datele clinice ar putea ajuta la elucidarea expresiei și evoluției clinice a adenoamelor hipofizare plurihormonale. Pe baza acestor observații și a cercetărilor precedente asupra adenoamelor hipofizare provenite din zona de sud și de est a României, s-a realizat o comparație a profilului hormonal din cele două zone, una din ele (România) incomplet caracterizată iar cealaltă (Republica Moldova) deloc caracterizată până în prezent. Această comparație pe un număr relativ similar de cazuri, a scos în evidență predominantă unui tip sau altui tip hormonal dependent de regiune și, mai mult a remarcat prezența triplelor asocieri și a asocierilor de 4 hormoni caracteristice Republicii Moldova și într-o mai mică măsură (cele triple) sau chiar absente (asocierile cu 4 hormoni) pentru zona de sud a României. Este prima utilizare a datelor profilului hormonal al adenoamelor hipofizare din Republica Moldova într-un studiu comparativ publicat într-o revistă cotată ISI.

Prin trecerea în revistă a factorilor predictivi și terapeutici s-a evidențiat lipsa eficienței lor în scăderea recurențelor și creșterea supraviețuirii pe termen lung. În acest moment nu există un factor predictiv unanim acceptat și nici factori eficienți care să influențeze terapia medicamentoasă. Mai mult, rata de proliferare a adenoamelor hipofizare este considerată ca având un rol important în invazie și în afectarea țesuturilor adiacente regiunii selare.

Factorii de creștere și receptorii corespondenți sunt puțin studiați în adenoamele hipofizare. Dacă despre factorii ca VEGF sau EGFR există date puține în literatura ce studiază adenoamele hipofizare, despre alți factori cum ar fi oncoproteina HER2 sau factorul de creștere derivat din plachete (PDGF A, B și receptorii corespondenți) nu sunt studiați în literatură pe țesuturi umane ci doar în modele experimentale. Ca un paradox, factorul de creștere al endoteliului vascular derivat din glandele endocrine care a fost pentru prima oară descris și izolat din hipofiza bovină, nu a fost studiat pe adenoamele hipofizare umane. Expresia, distribuția și efectele prezentei sale în adenoamele hipofizare sunt practic necunoscute în acest moment.

Un singur articol în literatură a raportat expresia sa în adenoamele hipofizare umane și a stipulat faptul că expresia acestuia scade în adenoamele hipofizare comparativ cu hipofiza normală. Din aceste motive, am ales ca temă de studiu expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare în mod diferențiat pentru fiecare tip de adenom hipofizar. Rolul prognostic al EG VEGF este practic necunoscut în acest moment. La fel ca și al formei inhibitorii a VEGF, respectiv VEGF165b. Studiul VEGF165b a fost abordat în această teză pornind de la observația reducerii numărului de vase în adenoamele hipofizare comparativ cu țesutul hipofizar normal.

Cu excepția fragmentului inhibitor al prolactinei, care reprezintă singura sursă acceptată de factor inhibitor al celulelor endoteliale din adenoamele hipofizare secretante de PRL alături de un singur articol privind efectul endostatinului seric crescut asupra diminuării numărului de vase tumorale din adenoamele hipofizare, studiul VEGF165b întregeste tabloul potențialilor factori inhibitori ai vaselor din adenoamele hipofizare. În mod paradoxal, varianta inhibitorie a VEGF, a fost subexprimată în adenoamele hipofizare. Supraexpresia sa s-a suprapus cu cea a VEGF doar în 18% din cazuri, ceea ce reprezintă un procent extrem de redus pentru a putea explica absența vaselor de neoformare din aria tumorală. Acest aspect sugerează că inhibarea vaselor tumorale include nu doar un singur factor ci o etiologie complexă, concurentă pentru realizarea acestui aspect paradoxal care caracterizează

ză vasele din adenoamele hipofizare. Un aspect interesant al expresiei VEGF165b a fost distribuția celulelor pozitive în jurul vaselor mari, preexistente, ceea ce a sugerat un aspect de inhibiție a activării celulelor endoteliale precoce în evoluția adenoamelor hipofizare. Această parte a studiului poate fi considerată un element de originalitate al prezentei cercetări, nefiind realizată anterior pe țesutul hipofizar adenomatos. PDGF A și B și receptorii corespondenți alfa și beta sunt bine cunoscuți ca fiind factori proangiogenici cu acțiune dublă asupra celulelor endoteliale și perivasculare dar și ca factori puternic mitogeni asupra celulelor tumorale. În ciuda faptului că efectul PDGF a fost menționat pentru prima dată în literatură în anul 1983 pentru culturile de celule secretante de prolactină, ca având un efect inhibitor al sintezei acestui hormon, rolul axului PDGF/PDGFRs în adenoamele hipofizare nu este elucidat încă și, nu există o terapie bazată pe expresia acestor factori în adenoamele hipofizare. Studiul de față a demonstrat că axul PDGF/PDGFRs are un efect asupra pattern-ului de creștere al adenoamelor hipofizare și asupra caracterului secretor al acestora. Expresia VEGF și PDGF se suprapune în adenoamele hipofizare ceea ce sugerează efectul sinergic al potențialului mitogen pe de o parte și, pe de altă parte potențierea reciprocă a sintezei și acțiunii autocrine sau paracrine.

Rata de proliferare a adenoamelor hipofizare pentru Ki67 a fost demonstrat ca fiind o unealtă utilă în măsurarea proliferării tisulare și, din acest motiv, a fost studiat extensiv. În prezentul studiu două observații importante au fost remarcate: rata de proliferare foarte mare în adenoamele hipofizare cu celule acidofile și cu pattern papilar.

Raportat la profilul hormonal, asocierile GH-PRL au fost cel mai intens proliferante urmate de asocierile PRL ACTH care au prezentat cea mai mare rată de proliferare. Totodată în cadrul acestui grup de înalt proliferante am remarcat și asocierile FSH-LH. Corelații semnificative între rata de proliferare și tipul hormonal au fost observate pentru PRL, FSH și LH.

Un alt aspect controversat și puțin studiat, prezent în teza de față este studiul proteinei S100 și a proteinei gliale fibrilare acide, nu doar la nivelul celulelor folicular stelate dar și în celulele tumorale ale adenoamelor hipofizare. Dacă până în prezent, majoritatea studiilor sunt focusate pe celulele foliculostelate care este știut ca exprima GFAP și proteina S100, prezentul studiu a încercat să asocieze expresia acestor doi markeri în celulele tumorale cu factorii de creștere studiați în prezenta lucrare. Principala concluzie care a rezultat din acest studiu a fost că expresia GFAP și proteinei S100 în celulele tumorale este implica-

tă în patogeneza adenoamelor hipofizare GH și PRL secretante, mecanismele de activare fiind incomplet studiate în prezent. Acest aspect pare să reprezinte un factor de prognostic nefavorabil care guvernează fenomenul de retrodiferențiere și susține prezența celulelor stem pluripotente.

Mai mult, în raport cu factorii de creștere, au fost definite două subtipuri moleculare de celule foliculostelate, respectiv GFAP+/VEGF+/S100- și o altă GFAP-/S100+/EGFR+ concomitent cu varianta clasică GFAP+/S100+. Aceste subtipuri pot fi considerate utile pentru încadrarea în terapia cu Bevacizumab sau în terapia anti-EGFR.

Datorită expresiei sale în celulele tumorale și celulele folicular stelate, aplicarea terapiei anti-VEGF ar putea avea o țintă dublă.

Un aspect particular din punct de vedere al studiului factorilor de creștere și celorlalți parametri incluși în prezentul material se referă la adenoamele hipofizare care secretă ACTH sau care au asociat ACTH în cadrul aspectului plurihormonal. Distribuția VEGF cu aspect insular a coincis cu expresia ACTH cu aceeași localizare. Acestea au fost cele mai înalt proliferante, au exprimat GFAP și S 100 doar în celulele folicular stelate care au avut o distribuție particulară în palisadă, în jurul unor spații similare cu spațiile vasculare din alte tipuri tumorale. Asocierea hormonală de tipul PRL-ACTH a fost întâlnită în studiul nostru într-un procent de 3,27% din cazuri. Pe lângă rata de proliferare foarte mare observată în studiul nostru, la același profil hormonal s-a raportat și o corelație semnificativă cu expresia EGFR.

În adenoamele ACTH secretante, expresia GFAP a fost restricționată la nivelul celulelor folicular stelate care au avut o distribuție particulară, celulele tumorale fiind negative. A fost observată o creștere a densității celulelor FS GFAP+ comparativ cu hipofiza normală.

Datele proteice au necesitat confirmare prin metoda de *hibridizare in situ* pe secțiuni la parafină. Expresia VEGF, a PDGFR beta precum și a podoplaninei au fost certificate prin această metodă. Dacă pentru cele menționate mai sus, RNA *scope* a avut o valoare confirmativă, pentru proteina HER2/neu această metodă a infirmat expresia proteică și a descalificat acest marker din rândul factorilor cu un potențial rol prognostic și terapeutic în ciuda faptului că acesta a fost pozitiv într-un procent similar cu cel din tumorile mamare cu metastaze și a fost asociat (întâmplător sau nu) cu expresia FSH și LH.

Prezenta lucrare nu numai că certifică existența diferențelor moleculare ale expresiei factorilor de creștere la nivelul adenoamelor hipofizare dar deschide noi perspective pentru continuarea creionării unor

subgrupe moleculare în cadrul aceluiași profil hormonal de exemplu. Adăugarea expresiei diferențiate a factorilor de creștere la profilul hormonal al adenoamelor hipofizare ar putea stratifica pacienții din punct de vedere clinic, diagnostic și terapeutic. Mai mult, implicarea factorilor de creștere și al podoplaninei în invazia tumorală și în recurențele apărute în unele tipuri agresive de adenoame hipofizare, certificate în prezenta lucrare deschid noi direcții de cercetare privind aprofundarea studiului hipofizei normale și a adenoamelor hipofizare la nivel molecular prin identificarea co-factorilor implicați în patogeniza adenoamelor hipofizare.

Continuarea studiului multicentric inițiat în cadrul studiului de față este obligatorie pentru zona de est și sud est a Europei, cât și pentru toată aria Republicii Moldova. Eterogenitatea etnică a populației din Republica Moldova alături de particularitățile comportamentale legate de obiceiurile alimentare, stilul de viață, tradiții, stau la baza profilului particular al adenoamelor hipofizare dar factorii etiologici și epidemiologici sunt nestudiați în această arie geografică.

Datele științifice, epidemiologice și statistice prezentate pe parcursul acestei lucrări reprezintă aspecte originale ale studiului hipofizei în zona Republicii Moldova. Aspectele noi prezentate vor avea cu siguranță un impact clinic și terapeutic asupra îmbunătățirii calității vieții pacienților cu adenoame hipofizare din zona de unde acestea au provenit.

Concluzii:

➤ Inițierea unei terapii personalizate țintite bazate pe expresia diferențiată a diferitor markeri ce ar putea îmbunătăți prognosticul pe termen lung al pacienților cu adenoame hipofizare, mai ales, în cazul recurențelor.

➤ Studiul de față a identificat pentru prima dată aspectele particulare ale adenoamelor hipofizare din Republica Moldova, punctând aspectele specifice pentru această regiune geografică, comparativ cu România.

➤ Identificarea unor potențiali factori etiologici sau comportamentali locali, la care a influențat variabilitatea adenoamelor hipofizare, reprezintă o direcție de viitor al prezentului studiu.

Bibliografie

1. Ezzat S., Asa S.L., 2004. *The prevalence of pituitary adenomas*. Cancer 101:613-619.
2. Parent A.D., Bebin, 1981 *Incidental pituitary adenomas*. J Neurosurg 54:228-231.
3. Molitch M.E., *Pituitary tumours: pituitary incidentalomas*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2009 Oct; 23(5):667-75.
4. Asa S.L., and Ezzat, S. (2009) *The pathogenesis of pituitary tumors*. Annu. Rev. Pathol., 4: 97-126.
5. Levy A., (2008). *Stem cells, hormones, and pituitary adenomas*. J. Neuroendocrinol., 20, 139-40.
6. Perry A., and Scheithauer, B.W. (2006) *Commentary: Classification and grading of pituitary tumors. Observations of two working neuropathologists*. Acta Neuropathol., 111: 68-70.