

# CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E IMUNOISTOQUÍMICA DOS ADENOMAS CLINICAMENTE NÃO-FUNCIIONANTES DE HIPÓFISE

Jane Eyre Alves Ferreira<sup>1</sup>, Paulo Andrade de Mello<sup>2</sup>,  
Albino Verçosa de Magalhães<sup>3</sup>, Carlos Henrique Aguiar Botelho<sup>4</sup>,  
Luciana Anselmi Naves<sup>5</sup>, Vania Nosé<sup>6</sup>, Fernando Schmitt<sup>7</sup>

**RESUMO** - Adenomas clinicamente não-funçioantes de hipófise, não produzem clínica de hipersecreção hormonal. Por esse motivo, seus sinais e sintomas dependem de seu efeito de massa no sistema nervoso central. A sua etiopatogenia é complexa com vários fatores provavelmente influenciando seu desenvolvimento como os hormônios hipotalâmicos (GHRH), fatores de crescimento (FGF), fatores de proliferação (PCNA, e Ki-67), proteína P53 e proto-oncogene c-erb-B2. *Objetivos* 1) Determinar as características clínicas da população de 117 pacientes tratados com adenoma clinicamente não-funçioante de hipófise (idade, sexo, tamanho do tumor, número de procedimento cirúrgico, desenvolvimento de deficiência hormonal e hiperprolactinemia). 2) Identificar, após a caracterização clínica desses pacientes, aqueles com adenoma clinicamente não-funçioante que apresentam imunistoquímica positiva para os hormônios hipofisários PRL LH, FSH, GH, TSH e ACTH. 3) Precisar nessa população a positividade imunistoquímica para o fator de proliferação celular Ki-67, para a proteína P53 e para a proteína C-erb-B2 correlacionando a sua positividade com o tamanho e invasão tumoral. Dessa forma avaliando o valor prognóstico desses fatores de proliferação. 4) Confrontar os resultados da imunistoquímica realizada através do bloco padrão com os resultados da imunistoquímica obtidos através do tissue micro-array. *Método*: Estudo das características clínicas de 117 pacientes com adenoma clinicamente não-funçioante de hipófise (idade, sexo, tamanho do tumor, número de procedimento cirúrgico, desenvolvimento de deficiência hormonal e hiperprolactinemia). Estudo imunistoquímico (H&E) de 39 pacientes para hormônios hipofisários, para a proteína P53, proteína C-erb-B2, Ki-67 e sua correlação com crescimento tumoral. A seguir, também foi realizado o tissue micro-array dos 39 casos, estudados anteriormente, com imunistoquímica para os hormônios hipofisários, para a proteína P53, proteína C-erb-B2, Ki-67 e sua correlação com o crescimento tumoral. *Resultados*: Não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos masculino e feminino com relação à idade, tamanho tumoral e número de procedimentos cirúrgicos ( $p=0,279$ ,  $p=0,813$ ,  $p=0,139$  respectivamente). Existe uma correlação estatisticamente significativa entre tamanho do tumor, número de procedimentos cirúrgicos realizados e deficiência hormonal ( $p=0,032$ ,  $p=0,0223$  respectivamente). Não houve correlação estatisticamente significativa entre imunistoquímica positiva para proteína P53, para a proteína C-erb-B2, Ki-67 e o tamanho do tumor ( $r=0,182$ ,  $p=0,396$ ;  $r=-0,181$ ,  $p=0,397$ ;  $r=0,272$ ,  $p=0,199$ , respectivamente). O tissue micro-array também não demonstrou uma correlação entre a imunistoquímica positiva para Ki-67 e C-erb-B2 e o tamanho do tumor, porém mostrou uma correlação negativa estatisticamente significativa entre a positividade imunistoquímica para p53 e o tamanho do tumor ( $r=-0,696$ ;  $p<0,001$ ). *Conclusão*: O adenoma clinicamente não-funçioante possui comportamento biológico semelhante em ambos os sexos. Quanto maior o tamanho do tumor maior o número de procedimentos cirúrgicos necessários e a ocorrência de deficiência hormonal. Esse trabalho sugere que a positividade imunistoquímica para p53 correlaciona negativamente com o tamanho do tumor, demonstrando ter valor prognóstico. Já a imunistoquímica positiva para o Ki-67 a proteína C-erb-B2 não parece ser um fator prognóstico nos adenomas de hipófise clinicamente não-funçioantes, como são em outros tipos de neoplasias.

**PALAVRAS-CHAVE**: adenoma não-funçioante, hipófise, fatores de proliferação, P53, Ki-67, c-erb-B2.

<sup>1</sup>Departamento de Neuroendocrinologia da Universidade Nacional de Brasília Brasília DF, Brasil (UNB); <sup>2</sup>Chefe do Departamento de Neurocirurgia UNB; <sup>3</sup>Chefe do Departamento de Patologia UNB; <sup>4</sup>Departamento de Patologia UNB; <sup>5</sup>Chefe do Departamento de Neuroendocrinologia UNB; <sup>6</sup>Chefe do Departamento de Patologia da Universidade de Harvard (EUA); <sup>7</sup>Chefe do Departamento de Patologia da Universidade de Porto (Portugal).

Recebido 12 Abril 2005, recebido na forma final 13 Julho 2005. Aceito 30 Agosto 2005.

Dra. Jane Eyre Alves Ferreira - Rua 84 / Edifício Dona Alice / Apto. 303 / Setor Sul - 74080-400 Goiânia GO - Brasil. E-mail: janeyreif@yahoo.com.br

### Non-functioning pituitary adenomas: clinical features and immunohistochemistry

**ABSTRACT** - Clinically non-functioning pituitary adenomas do not produce clinical signs of hormonal hypersecretion. Therefore, signs and symptoms will depend on the mass effect of these adenomas over the central nervous system. Their etiopathogeny is complex and their development is probably influenced by several factors, such as hypothalamic hormones (GHRH), growth factors (FGF), proliferation factors (PCNA, and Ki-67), protein P53 and the proto-oncogene c-erb-B2. *Objective:* 1) Determining the clinical features of a population of 117 patients treated for clinically non-functioning pituitary adenoma (age, sex, tumor size, number of surgical procedures, development of hormonal deficiency and hyperprolactinemia). 2) Identifying, after the patients had been clinically characterized, those with clinically non-functioning adenomas with positive immunohistochemistry for hypophyseal hormones (PRL, LH, FSH, GH, TSH and ACTH). 3) Determining if the immunohistochemistry of this population was positive for the cellular proliferation factor Ki-67, protein P53 and protein C-erb-B2 and establishing a correlation with tumor size and tumor invasiveness. This will help in the evaluation of the prognostic value of these proliferation factors. 4) Confronting the results of immunohistochemistry using a standard block with the results of immunohistochemistry using a tissue micro-array. *Method:* Study of the clinical features of 117 patients with clinically non-functioning pituitary adenoma (age, sex, tumor size, number of surgical procedures, development of hormonal deficiency and hyperprolactinemia). Immunohistochemical study (H&E) of 39 patients for hypophyseal hormones, protein P53, protein C-erb-B2, Ki-67 to establish their correlation to tumor growth. The next step was a tissue micro-array of the 39 previously studied cases, using immunohistochemistry for hypophyseal hormones, protein P53, protein C-erb-B2, Ki-67 to establish their correlation to tumor growth. *Results:* There was no statistically significant difference between males and females with regards to age, tumor size and number of surgical procedures ( $p=0.279$ ,  $p=0.813$ ,  $p=0.139$  respectively). There is a statistically significant correlation between the size of the tumor, the number of surgical procedures and hormonal deficiency ( $p=0.032$ ,  $p=0.223$  respectively). There was no statistically significant correlation between a positive immunohistochemistry for protein P53, protein C-erb-B2, Ki-67 and tumor size ( $r=0.182$ ,  $p=0.396$ ;  $r=-0.181$ ,  $p=0.397$ ;  $r=0.272$ ,  $p=0.199$ , respectively). The tissue micro-array also did not demonstrate a correlation between positive immunohistochemistry for Ki-67 and C-erb-B2 and tumor size, but it showed a statistically significant correlation between a positive immunohistochemistry for p53 and tumor size ( $r=0.696$ ;  $p=0.001$ ). *Conclusion:* The biological behavior of the clinically non-functioning adenoma is similar for both sexes. The larger the tumor the greater the number of surgical procedures needed. Hormonal deficiency also becomes more significant as the size of the tumor increases. This paper suggests that a positive immunohistochemistry for p53 is negatively correlated to tumor size, thus demonstrating that it has a predictor value. However, a positive immunohistochemistry for Ki-67 and protein C-erb-B2 does not seem to be a prognostic factor for clinically non-functioning pituitary adenomas, as is the case with other neoplasias.

**KEY WORDS:** non-functioning pituitary adenomas, adenoma, pituitary, proliferation factors, P53, Ki-67, c-erb-B2.

São denominados adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes aqueles que não apresentam clínica de hiper-secreção hormonal. Esses adenomas correspondem de 25-30% dos adenomas de hipófise. Seus sinais e sintomas são devidos à compressão do parênquima cerebral e hipofisário que incluem hipopituitarismo, cefaléia e alterações neurológicas dentre elas o defeito do campo visual<sup>1</sup>. Apesar desses adenomas não produzirem clínica de hipersecreção hormonal, 86% deles apresenta imuno-histoquímica positiva para pelo menos uma subunidade de hormônio glicoproteico. A imuno-histoquímica é, freqüentemente, positiva para FSH, LH ou subunidade- $\alpha$ . Sendo que 8,1% são adenomas corticotróficos silenciosos e 2,7% são adenomas somatotróficos silenciosos<sup>1</sup>. Já do ponto de vista sérico os adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes podem apresentar aumento nos

níveis de FSH, LH ou subunidade- $\alpha$ <sup>1</sup>. O diagnóstico diferencial dos adenomas de hipófise deve ser feito entre craniofaringeomas, meningeomas, cisto aracnóide, doenças granulomatosas, gliomas, tumores metastáticos e cordomas<sup>1</sup>. A incidência de deficiência hormonal nos casos de adenoma de hipófise clinicamente não-funcionante é de 100% para o eixo somatotrófico, 96% para o eixo gonadotrófico, 82% para o eixo tireotrófico e 62% para o eixo corticotrófico<sup>1</sup>. A patogênese dos adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes compreende um processo complexo que envolve múltiplos passos onde uma célula geneticamente transformada sofre influência de vários fatores endógenos resultando no crescimento neoplásico e comportamento biológico do tumor. Esses adenomas são monoclonais, como já foi determinado pela análise do cromossoma x e pelo método da hipoxantina

fosforribosil transferase<sup>2</sup>. Essa transformação celular envolve eventos genéticos ou mutações. Alguns genes envolvidos no ciclo celular sofrem mutações inativadoras levando a inibição da transcrição do gene mutado ou transcrição de uma proteína inativa referente àquele gene. Essa mutação também pode ser responsável por uma transformação celular que propicia a proliferação celular e o crescimento neoplásico. Esses genes são denominados genes de supressão tumoral. Mutações no gene de supressão tumoral MEN-1 só foi identificada nos casos de neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e não nos casos de adenoma de hipófise esporádicos. Já mutações nos genes de supressão tumoral p53, nm23 e gene do retinoblastoma (Rb), não foram consistentemente identificadas e/ou relacionadas aos adenomas de hipófise nos estudos realizados até o momento<sup>2</sup>.

A proteína P53 é uma proteína tetramérica intranuclear guardiã do ciclo de divisão celular. Tem como função o bloqueio da divisão celular de células geneticamente transformadas e, portanto, a perda da sua função propiciaria o crescimento tumoral<sup>3</sup>. Entretanto, o panorama da correlação entre o comportamento biológico dos adenomas de hipófise, proteína P53, fatores de proliferação Ki-67 e PCNA é controverso. Alguns estudos mostram correlação da expressão desses fatores de proliferação e o crescimento tumoral nos adenomas de hipófise, outros já não apresentam essa correlação<sup>4-16</sup>. O *c-erb-B2* um proto-oncogene codificador de receptor de membrana do tipo tirosina - quinase. A sua expressão está sabidamente aumentada nos casos de carcinoma mamário com comportamento biológico agressivo<sup>17-26</sup>. Já nos adenocarcinomas hepáticos, mesoteliomas e carcinoma de ducto salivar a alteração na expressão do *c-erb-B2* é controversa<sup>27-29</sup>. Foi demonstrada recentemente a expressão da proteína *C-erb-B2* no carcinoma de hipófise<sup>30</sup>, entretanto, ainda não foi estudada a relação entre expressão da proteína *C-erb-B2* e o comportamento biológico dos adenomas de hipófise. Realizamos, nesse trabalho, a caracterização clínica dos pacientes com adenoma clinicamente não-funcionante de hipófise quanto a sexo, idade, tamanho do tumor, número de procedimentos cirúrgicos e deficiência hormonal. Caracterizamos esses adenomas quanto a presença imunistoquímica dos hormônios hipofisários FSH, LH, GH, TSH, ACTH e PRL. Determinamos também a correlação entre a positividade imunistoquímica para proteína P53, *C-erb-B2*, Ki-67 e o tamanho do tumor.

Este estudo tem como objetivos principais: 1)

Determinar as características clínicas da população de 117 pacientes tratados com adenoma de hipófise clinicamente não-funcionante no Hospital Universitário de Brasília. As características clínicas avaliadas são com relação ao sexo, idade, tamanho do tumor, níveis hormonais séricos pré e pós-cirúrgicos, ocorrência de deficiência hormonal e número de cirurgias realizadas; também foi avaliada a correlação entre a ocorrência de deficiência hormonal, número de cirurgias e o tamanho tumoral; e por fim a correlação entre os níveis séricos de prolactina e o tamanho tumoral. 2) Identificar, após a caracterização clínica desses pacientes, aqueles com adenoma clinicamente não-funcionante que apresentam imunistoquímica positiva para PRL, LH, FSH, GH, TSH e/ou ACTH. 3) Precisar nessa população a positividade imunistoquímica para o fator de proliferação celular Ki-67, para a proteína P53 e para a proteína *C-erb-B2* correlacionando sua positividade com o tamanho e invasibilidade tumoral. Dessa forma avaliando o valor prognóstico desses fatores de proliferação. 4) Confrontar os resultados da imunistoquímica realizada através do bloco padrão com os resultados da imunistoquímica obtidos através do tissue micro - a ray (TMA).

## MÉTODOS

Cento e dezessete pacientes diagnosticados com adenoma de hipófise clinicamente não-funcionante, foram avaliados e tratados nas áreas de neuro-endocrinologia e de neurocirurgia do Hospital Universitário de Brasília, durante o período de 1993 a 2003. Desses pacientes, 67 eram do sexo feminino e 50 do masculino.

Durante a avaliação clínica desses pacientes a determinação dos valores séricos dos hormônios hipofisários foi realizada através do método imunofluorimétrico e o tamanho do tumor foi determinado através da tomografia computadorizada da sela túrcica.

Dos 117 pacientes analisados clinicamente só foi possível realizar estudo imunistoquímico de 39 pacientes para os hormônios hipofisários FSH, LH, TSH, GH, PRL e ACTH, para o fator de proliferação Ki67, proteína P53 e para proteína *C-erb-B2*. Nas reações imunistoquímicas, os anticorpos utilizados para FSH, LH, TSH, GH, PRL, ACTH e *C-erb-B2* eram policlonais (Dako) e os utilizados para detecção dos fatores de proliferação P53 e Ki-67 foram monoclonais (Dako). As seções de tecidos obtidas dos blocos de parafina foram desparafinizadas e a peroxidase endógena bloqueada com peróxido de hidrogênio. As lâminas contendo as seções de tecido foram submetidas a técnica de recuperação antigênica em solução de citrato de sódio a 90°C. As reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e contracoradas com hematoxilina. Os anticorpos utilizados e suas res-

pectivas diluições foram os seguintes:FSH (150), LH (1:800), TSH (1:700), GH (1:150), PRL (1:300), ACTH (1:300), P53 (1:50), Ki-67 (1:50) e C-erb-B2 (1:50).

Os 39 casos de adenoma de hipófise clinicamente funcionante, estudados anteriormente, também foram estudados através da técnica de tissue micro-array. Todos os casos eram embebidos em um bloco de parafina padrão. Uma área representativa do tumor foi selecionada de suas respectivas sessões coradas com H&E. A área correspondente foi marcada na superfície do bloco de parafina padrão e foi biopsiada usando agulha adequada. Todas as biopsias (com 0,135cm de diâmetro) foram colocadas em bloco TMA, usando o Kit comercialmente disponível (abcam, Cambridge, Inglaterra). O bloco TMA foi rotineiramente cortado e os tecidos montados em lâminas auto-adesivas (ply-l-lysine, Sigma, Deisenhofen, Alemanha). O procedimento, a seguir, foi idêntico ao utilizado com o bloco de parafina padrão anteriormente e descrito. Foi realizada imunistoquímica de 39 casos para os hormônios hipofisários para o fator de proliferação Ki-67, proteína P53 e para a proteína C-erb-B2.

A análise imunistoquímica semiquantitativa do fator de proliferação Ki-67 foi avaliada pelo protocolo de Pierga et al<sup>31</sup>. Por sua vez, análise imunistoquímica semiquantitativa da proteína P53 seguiu o protocolo de Schmitt et al<sup>32</sup>. Já a análise imunistoquímica semiquantitativa da proteína C-erb-B2 seguiu protocolo de Muss<sup>33</sup> e Slamon et al.<sup>34</sup>.

## RESULTADOS

**Caracterização clínica** – Na avaliação dos 117 pacientes com adenoma de hipófise, 50 são do sexo masculino e 67 do feminino, não havendo diferença estatisticamente significativa quanto a frequência de ambos os sexos (*t-Test*,  $p=0,279$ ). Também não houve diferença estatisticamente significativa na média de idade entre o grupo de pacientes do sexo feminino e masculino (Gráfico 1).

No estudo da correlação do tamanho do tumor (mm) em relação ao sexo não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (Gráfico 2).

Também não houve diferença estatisticamente significativa, na correlação do número de procedimentos cirúrgicos realizados e o sexo dos pacientes (Gráfico 3).

A correlação entre o tamanho do tumor e a ocorrência de deficiência hormonal, bem como a correlação entre o tamanho do tumor e o número de cirurgias realizadas foram estatisticamente significativas. As correlações entre o tamanho do tumor e idade e entre tamanho do tumor e níveis séricos de prolactina não foram estatisticamente significantes (Tabela 1).

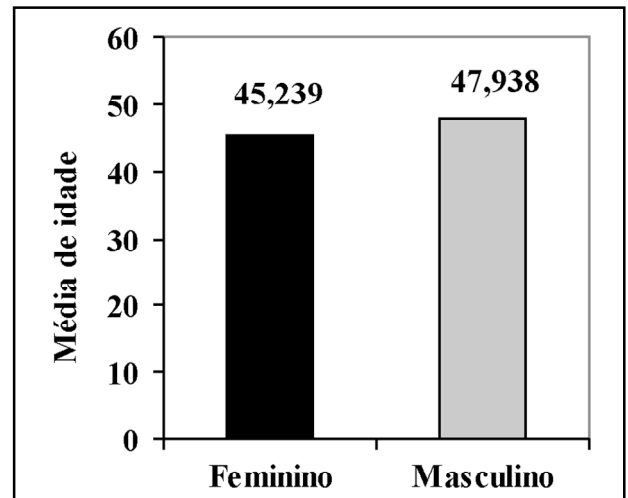


Gráfico 1. Estudo dos adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes. Correlação da média de idade entre os pacientes femininos e masculinos. *t-test*  $p=0,279$ ;  $IC=-7,616$ .

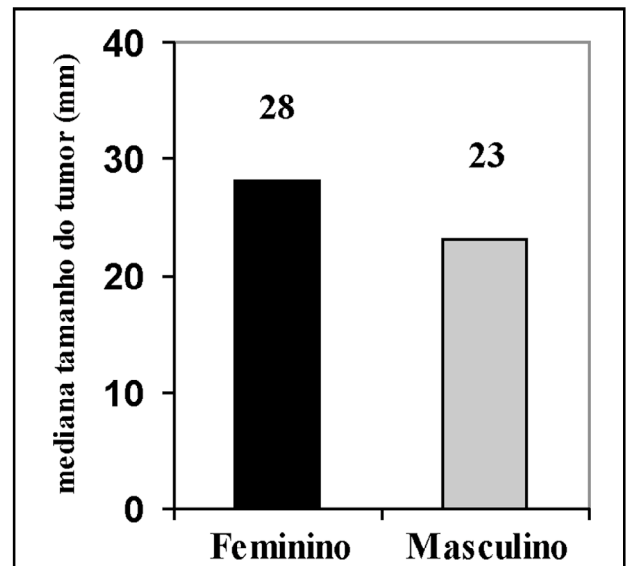


Gráfico 2. Estudo dos adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes. Correlação entre o tamanho do tumor e sexo dos pacientes. *Mann Whitney Rank Sum Test*,  $p=0,813$ .

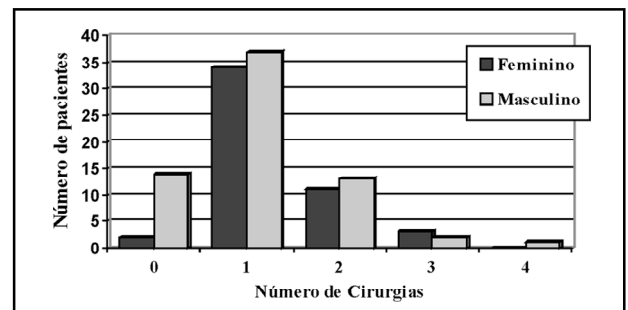


Gráfico 3. Estudo dos adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes. Correlação entre o número de procedimentos cirúrgicos nos sexos masculino e feminino. *Mann Whitney Rank Sum Test*,  $p=0,139$ .

*Tabela 1. Estudo dos adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes. Correlação entre o tamanho do tumor, deficiência hormonal, número de cirurgias, idade dos pacientes e níveis séricos de prolactina.*

	Deficiência hormonal	Número de cirurgias	Idade dos pacientes	Níveis séricos de prolactina
Coefficiente de correlação	0,2923	0,262	-0,015	-0,1057
Valor de p	0,0223	0,032	0,9103	0,43381

Spearman Correlation Test

*Tabela 2. Adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes. Distribuição de freqüência dos resultados das reações imunoistoquímicas para hormônios hipofisários.*

Imunorreações	Freqüência	Porcentagem
Ausência de reação	26	66,7%
Positividade para PRL	4	10,3
Positividade para FSH e LH	3	7,7%
Positividade para FSH, LH e TSH	1	2,6%
Positividade para GH e TSH	1	2,6%
Positividade para LH	1	2,6%
Positividade para FSH, LH, TSH, ACTH, GH e PRL	3	7,7%
Total	39	100%

*Tabela 3. Estudo dos adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes. Correlação entre tamanho do tumor e imunoistoquímica positiva para proteína C-erb-B2, P53 e Ki-67.*

Fator	Medidas Estatísticas		r <sup>(1)</sup>	p
	Média (tu-mm)	Desvio Padrão		
<b>C-erb-B2</b>				
0	48	9,342	-0,181	0,397
1+	25	17,979		
2+	30	8,89		
3+	30	9,67		
<b>P53</b>				
0	28	10,784	0,182	0,396
1+	25	10,309		
2+	35	17,222		
3+	35	15,548		
4+	47	24,740		
<b>Ki 67</b>				
0	43	11,692	0,272	0,199
1+	30	8,195		
2+	65	15,928		

Spearman Correlation Test

Tabela 4. Tissue Micro-Array. Distribuição de freqüência dos resultados das reações imunoistoquímicas para hormônios adenohipofisários.

Imunorreações	Freqüência	Porcentagem
Ausência de reação	17	43,59%
Positividade para PRL	9	23,08%
Positividade para PRL e LH	4	10,25%
Positividade para PRL e FSH	1	2,56%
Positividade para FSH, LH e TSH	1	2,56%
Positividade para GH, PRL e ACTH	3	7,70%
Positividade para ACTH	2	5,13%
Positividade para FSH, LH, TSH e PRL	2	5,13%
Total	39	100%

Tabela 5. Estudo dos adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes Tissue Micro-Array. Correlação entre tamanho do tumor e imunoistoquímica positiva para proteína C-erb-B2, P53 e Ki-67.

Fator	Medidas estatísticas		r <sup>(1)</sup>	P
	Média(tu-mm)	Desvio Padrão		
C-erb-B2				
0	52,500	17,870		
1+	36,429	17,678	-0,312	0,147
2+	32,000	16,280		
3+	21,667	7,638		
P53				
0	41,000	14,937		
1+	13,000	4,243	-0,696	<0,001
2+	18,333	2,887		
3+	-	-		
Ki 67				
0	38,556	17,917	*	*
1+	-	-		
2+	-	-		
3+	-	-		

Spearman Correlation Test, \*Não foi possível obter a correlação.

**Análise imunoistoquímica** – A análise imunoistoquímica para hormônios FSH, LH, GH, TSH, ACTH e PRL foi realizada em 39 pacientes com adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes. Os resultados da freqüência de imunoistoquímica positiva para esses hormônios estão demonstrados na Tabela 2.

A correlação entre a positividade imunoistoquímica para a proteína C-erb-B2, P53, Ki-67 e o tamanho do tumor foi realizada em 39 pacientes. O teste de análise estatística utilizado foi o *Spearman Correlation Test* (Tabela 3). Não houve correlação estatisticamente significativa entre imunoistoquímica positiva para proteína C-erb-B2, P53, Ki-

67 e o tamanho do tumor ( $r=-0,181$ ,  $p=0,397$ ;  $r=0,182$ ,  $p=0,396$ ;  $r=0,272$ ,  $p=0,199$ , respectivamente). (Tabela 3).

**Tissue micro-array** – O *Tissue Micro-Array* para hormônios FSH, LH, GH, TSH, ACTH e PRL foi realizado em 39 pacientes com adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes. Os resultados da freqüência de imunoistoquímica positiva para esses hormônios adenohipofisários estão demonstrados na Tabela 4.

A correlação entre a imunoistoquímica positiva para proteína C-erb-B2, P53, Ki-67 e o tamanho do tumor foi realizada em 24 pacientes. O teste

Tabela 6. Estudo dos adenomas de hipófise clinicamente não-funcionantes. Comparação dos resultados da análise imunoistoquímica semiquantitativa e tissue micro-array para as proteínas C-erb-B2, P53 e Ki-67.

Fator	Imunoistoquímica		Tissue micro-array	
	Nº de casos	Porcentagem	Nº de casos	Porcentagem
<b>C-erb-B2</b>				
0	4	10,25%	3	7,69%
1+	4	10,25%	7	17,94%
2+	13	33,34%	22	56,41%
3+	18	46,16%	5	12,82%
Missing	0	0%	2	5,14%
Total	39	100%	39	100%
<b>P53</b>				
0	7	17,95%	29	74,35%
1+	4	10,25%	3	7,7%
2+	5	12,85%	4	10,25%
3+	17	43,56%	0	0%
4+	6	15,39%	0	0%
Missing	0	0%	3	7,7%
Total	39	100%	39	100%
<b>Ki-67</b>				
0	13	33,34%	35	89,75%
1+	23	58,98%	0	0%
2+	2	5,12%	0	0%
3+	1	2,56%	0	0%
Missing	0	0%	4	10,25%
Total	39	100%	39	100%

de análise estatística utilizado foi o *Spearman Correlation Test*. Não houve correlação estatisticamente significativa entre imunoistoquímica positiva para C-erb-B2 e o tamanho do tumor ( $r=-0,312$ ,  $p=0,147$ ). Houve uma correlação negativa estatisticamente significativa entre o fator de proliferação P53 e o tamanho do tumor ( $r=-0,696$ ,  $p<0,001$ , respectivamente). Não foi possível correlacionar a positividade imunoistoquímica do fator de proliferação Ki-67 e o tamanho do tumor, uma vez que a imunoistoquímica para Ki-67 foi negativa em todos os casos (Tabela 5).

Os resultados da análise imunoistoquímica semiquantitativa do bloco padrão e do *tissue micro-array* para as proteínas C-erb-B2, P53 e Ki-67 não foram similares, conforme demonstrado na Tabela 6.

## DISCUSSÃO

Nesse trabalho foram avaliados 117 pacientes com adenoma clinicamente não-funcionante de

hipófise, sendo 67 do grupo feminino e 57 do grupo masculino. Apesar da descrição da presença de receptores estrogênicos em células de adenoma de hipófise<sup>35</sup>, isso não refletiu na distribuição desses tumores quanto ao sexo ( $p=31,075$ ). A média de idade no sexo masculino foi 47,239 anos e no sexo feminino foi 45,239 anos, não havendo diferença estatisticamente significativa, estando de acordo com a literatura<sup>35</sup> (Gráfico 1). A correlação entre tamanho do tumor e sexo (Gráfico 2), e entre número de procedimento cirúrgico e sexo (Gráfico 3) também não foi estatisticamente significativa. Isso sugere que o sexo dos pacientes provavelmente não influencie na evolução clínica desses adenomas.

O tamanho do tumor teve uma correlação estatisticamente significativa com o número de procedimentos cirúrgicos realizados e com a ocorrência de deficiência hormonal nesses pacientes, mostrando que quanto maior o tamanho do tumor, maior o número de procedimentos cirúrgicos

necessários e a probabilidade do paciente apresentar deficiência hormonal (hipopituitarismo) (Tabela 2). Esses dados são concordantes com os da literatura descritos por Larsen et al.

Como já descrito<sup>35</sup>, o macroadenoma de hipófise clinicamente não-funcionante pode apresentar aumento moderado dos níveis séricos de prolactina. Quando correlacionamos os níveis séricos de prolactina com o tamanho do tumor essa correlação não foi estatisticamente significativa (Tabela 1), sugerindo que provavelmente mais importante que o tamanho do tumor é o comprometimento da haste hipofisária com a perda do controle regulatório dopaminérgico sobre a secreção de prolactina, causando o aumento dos níveis séricos desse hormônio (Tabela 1).

A caracterização dos adenomas clinicamente não-funcionantes de hipófise quanto à presença imunoistoquímica dos hormônios hipofisários demonstrou que 66,06% deles apresentaram imunoistoquímica negativa para todos os hormônios hipofisários. (Tabela 2). No estudo realizado através de *tissue micro-array* 43,59% dos casos foram negativos para todos os hormônios adenohipofisários. (Tabela 4). Esses resultados mostram que a avaliação clínica na grande maioria das vezes coincide com a avaliação imunoistoquímica.

Foi observada imunoistoquímica positiva para proteína C-erb-B2 em dois casos de carcinoma hipofisário<sup>30</sup>. Porém não tem na literatura nenhum estudo de impacto da imunoistoquímica para C-erb-B2 no comportamento biológico dos adenomas de hipófise. No estudo imunoistoquímico não houve correlação estatisticamente significativa, entre a imunoistoquímica positiva para C-erb-B2 e o tamanho do tumor. (Tabela 3). O estudo através do *tissue micro-array* confirmou esse resultado. (Tabela 5). Esses dados sugerem que, talvez, o impacto da imunoistoquímica positiva para C-erb-B2 no adenoma de hipófise clinicamente não-funcionante seja menor do que já é estabelecido para o carcinoma de hipófise.

A proteína P53 é uma proteína tetramérica intranuclear guardiã do ciclo de divisão celular. Tem como função o bloqueio da divisão celular de células geneticamente transformadas e, portanto, a perda da sua função propiciaria o crescimento tumoral<sup>3</sup>. Os estudos de seqüenciamento genético não detectaram a presença de mutação no gene p53 nos adenomas hipofisários<sup>4</sup>. A correlação entre o crescimento tumoral e a imunoistoquímica posi-

tiva para P53 não foi encontrada em alguns estudos, entretanto, outros estudos encontraram uma frequência maior de mutação no gene p53 em adenomas hipofisários<sup>36</sup> e que a bromocriptina induziria a apoptose celular por ação da proteína P53<sup>37</sup>. O tratamento radioterápico desses adenomas, por sua vez, também pode induzir apoptose celular através da ação da proteína P53<sup>38</sup>. Alguns autores, diferentemente dos estudos citados anteriormente, encontram correlação estatisticamente significativa entre crescimento tumoral e imunoistoquímica positiva para P53<sup>9-11</sup>. Em virtude dos resultados conflitantes dos estudos executados até o momento, realizamos imunoistoquímica para P53. Imunoistoquímica positiva para P53 não demonstrou correlação estatisticamente significativa com o tamanho do tumor (Tabela 3). Porém o estudo realizado através da técnica de *tissue micro-array* mostrou uma correlação negativa estatisticamente significativa entre a positividade imunoistoquímica de P53 e o tamanho do tumor. (Tabela 5). Isso indica que a proteína P53 presente nos adenomas hipofisários provavelmente não seja mutante e está relacionada com menor capacidade de proliferação celular do tumor. Conseqüentemente, a imunoistoquímica para proteína p53 mostrou ter valor prognóstico.

Também é controversa a correlação entre a positividade imunoistoquímica para Ki-67 e o crescimento tumoral. Daita et al<sup>13</sup> e Atkin et al<sup>14</sup> mostraram uma correlação positiva, enquanto outros autores não confirmaram essa correlação<sup>12,15,16</sup>. Por esse motivo, também foi realizado nesse trabalho imunoistoquímica para Ki-67, tendo sido encontrada correlação negativa entre a positividade imunoistoquímica para Ki-67 e o tamanho do tumor, que não foi estatisticamente significativa. (Tabela 5). Já no estudo realizado através do *tissue micro-array*, todos os casos estudados apresentaram imunoistoquímica negativa para Ki-67 (Tabela 6) confirmando que esse fator de proliferação não demonstra ser um bom índice de proliferação celular nos casos de adenoma de hipófise.

Os resultados da análise imunoistoquímica semiquantitativa e do *tissue micro-array* não foram similares, o que pode ser justificado pelo fato do bloco de parafina padrão ter ressecado pelo tempo dificultando a biopsia ou pelo fato da amostragem feita pela biopsia não expressar toda a área do tumor presente no bloco de parafina padrão. (Tabela 6).



## REFERÊNCIAS

- Katznelson L, Joseph M, Alexander, Anne Klibanski. Clinically non-functional pituitary adenomas. *J Clin Endoc Met.* 1993;1089:1094.
- Melmed S, Shimon I, Pituitary tumor pathogenesis. *J Clin End Met* 1997;82:1675-1681.
- Lewin B. Genes V, CAP 39 Oncogenes: gene expression and cancer. *Genes Textbook* 2001.
- Levy A, Hall L, Yeudall WA, Lightman SL. P53 gene mutations in pituitary adenomas: rare events. *Clin Endocrinol* 1994;41:809-814.
- Suliman M, Royds J, Cullen D, et al. Mdm2 and the p53 pathway in human pituitary adenomas. *Clin Endocrinol* 2001;54:317-325.
- Oliveira MC, Marroni CP, Pizarro CB, Pereira-Lima JF, Barbosa-Coutinho LM. Expression of p53 protein in pituitary adenomas. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:561-565.
- Yin D, Tamaki N, Kokunai T, Yasuo K, Yonezawa K. Bromocriptine-induced apoptosis in pituitary adenoma cells: relationships to p53 and bel-62 expression. *J Clin Neurosci* 1999 Jul;6:326-331.
- Woloschak M, Yu A, Xiao J. Molecular and cellular responses to DNA damage in a murine pituitary adenoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 1996;119:61-68.
- Schreiber S, Seager W, Ludecke DK. Proliferation markers in different types of clinically non-secreting pituitary adenomas. *Pituitary* 1999;1:213-220.
- Tella OI Jr, Herculano MA, Delcelo R. Pituitary adenomas: relationship between invasiveness and proliferative cell nuclear index. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58:1055-1063.
- Klencki M, Kurnatowska I, Slowinska-Klencka D, Lewinski A, Pawlikowski M. Correlation between PCNA expression and AgNOR dots in pituitary. *Endocr Pathol* 2001;12:163-169.
- Asano , Kubo O, Tajika Y, Huang MC, Takakura K. The relation between cell proliferation activity and secretory in pituitary adenoma - a review of 63 cases.No To Shinkei 1996;48:543-549.
- Daita G, Yonemasu Y. Dural invasion and proliferative potencial of pituitary adenomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1996;36:211-214.
- Atkin SL, Green VL, Hipin LJ, et al. A comparasion of proliferation indices in human anterior pituitary adenomas using formalin-fixed and in vitro cell culture. *J Neurosurg* 1997;87:85-88.
- Blevins LS Jr, Verity DK, Allen G. Aggressive pituitary tumors. *Oncology* 1998;12:1307-1318.
- Mastronardi L, Guiducci A, Puzilli F, Maira G. Anterior pituitary adenomas in patients aged more than 65 years: analysis of growth fraction (using the MIB-1 monoclonal antibody) and of clinical features in comparasion to younger patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:44-48.
- Tervahauta A, Eskelinen M, Syrjanen S, Lipponen P, Pajarinen P, Syrjanen K. Immunohistochemical demonstration of C-erb-B2 oncoprotein expression in female breast cancer and its prognostic significance. *Anticancer Res* 1991;11:1677-1681.
- Alexiev BA, Bassarova AV, Popovska SL, Popov AA, Christov CZ. Expression of c-erb-B2 oncogene and p53 tumor supressor gene in benign and malignant breast tissue: correlation with proliferative activity and prognostic index..*Gen Diagn Pathol* 1997;142:271-279.
- Ottesen GL, Christensen U, Larsen JK, et al. Immunohistochemical markers and DNA ploidy. *Breast Cancer Res Treat* 2000;60:219-226.
- Beenken SW, Grizzle WE, Crowe DR, et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis:coexpresion of C-erb-B2 and P53. *Ann Surg* 2001;233:630-638.
- Tsuitsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hashitanda Y. Comparison of the immunohistochemical expression do EGFR, C-erb-B2 e P53 protein between primary and recurrent breast cancer. *Breast Cancer* 2002;9:111-117.
- Tsuitsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hashitanda Y. Prognostic significance of the coexpression of P53 protein and C-erb-B2 in breast cancer. *Am J Surg* 2003;185:165-167.
- Tran DD, Lawson JS. Microcysts and breast cancer: a study of biological markers in archival biopsy material. *Breast Cancer Res Treat* 2002;75:213-220.
- Kedzia W, Schmidt M, Frankowski A, Spaczyaski M. Immunohistochemical assay of P53, cyclin D1, C-erb-B2, EGFR and Ki-67 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2002;40:37-41.
- Malle D, Patakiouta F, Bousoulegas A, Kamakitsos P, Destouni C. Image analysis (DNA ploidy) and expression of C-erb-B2 and P53 in imprint smears of breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003;24:531-534.
- Linderholm B, Andersson J, Lindth B, et al. Overexpression of C-erb-B2 is related to higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and constitutes an independent prognostic factor in primary node-positive .*Eur J Cancer* 2004;40:33-42.
- Vlasoff DM, Bachinsky D Y, De Yong BR, Morrison C D, Nuovo G J, Frankel W L. C-erb-B2 (Her2/ neu) is neither overexpressed nor amplified in hepatic neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:237-241.
- Hovai AE, Li L, Xu Z, Kramer MJ, Jablons DM, Treseler PA. Malignant mesotelioma does not demonstrate overexpression or gene amplification despite cytoplasmatic immunohistochemical staining for c-erb-B2. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:465-469.
- Sun H, Wu S, Ouyang J. Expression of C-erb-B2 oncogene mRNA in salivary gland tumors. *Zonghua Kou Quiang Yi Xue Za Zhi* 1999;34:289-291.
- Nose V, Scheithauer BW, Kovacs K, et al. Gonadotropic pituitary carcinoma:HER-2/ and gene amplification: report of two cases. *J Neurosurg* 2003;99:402-408.
- Pierga JY, Leoroyer A, Viehl P, Mosseri V, Chevillard S, Magdelenat H. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996;37:57-64.
- Schmitt FS, Soares R, Cirnes L. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semi quantitative approach. *Pathol Res Pract* 1998;194:815-819.
- Muss HB. Expression and response to adjuvant therapy in women with node positive breast cancer. *N Engl J. Med* 1994;330:1260-1266.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/ neu oncogene. *Science* 1997;235:177.
- Larsen, Kronenberg, Melmed, Polonsky. Williams Textbook of Endocrinology, 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 2003.
- Suhardja A, Kovacs K, Rutka J. Genetic basis of pituitary adenomas invasiveness: a review. *J Neurooncol* 2001;52:195-204.
- Yin D, Tamaki N, Kokunai T, Yasuo K, Yonezawa K. Bromocriptine-induced apoptosis in pituitary adenoma cells: relationships to p53 and bel-62 expression. *J Clin Neurosci* 1999;6:326-331.