

Estudo Histopatológico de Fibras Reticulínicas e Colágenas em Adenomas Hipofisários Classificados Conforme Critérios Atualizados da Organização Mundial da Saúde e com Diferentes Graus de Invasão do Seio Cavernoso

Palavras-Chave: Adenoma hipofisário; colorações especiais; fibras reticulínicas e colágenas

Autores(as):

Bruna da Silva Nascimento, FCM – UNICAMP

Prof. Dr. Fábio Rogério (orientador), Dep. Patologia/ FCM – UNICAMP

Coautores(as):

Eduardo Hadad Cherulli/ FCM – PUCCAMP

Arethusa de Souza, Dep. Patologia/ FCM – UNICAMP

Katariny Parreira de Oliveira Alves, Dep. Patologia/ FCM – UNICAMP

Heraldo Mendes Garmes, Dep. Clínica Médica/ FCM – UNICAMP

Mateus Dal Fabbro, Dep. Neurologia/ FCM – UNICAMP

INTRODUÇÃO

O adenoma hipofisário (AH) é uma neoplasia originada das células epiteliais glandulares da hipófise. Corresponde a 15% dos tumores intracranianos e é mais frequente em mulheres de 30 a 60 anos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) [1]. Os AHs podem ser classificados de diferentes formas, com base em dados de neuroimagem, clínicos, laboratoriais e histológicos.

Dentre as classificações de AHs, considerando-se imagens de ressonância magnética de crânio (RMC), as lesões são categorizadas de acordo com o seu tamanho [2]. Outra classificação baseia-se na apresentação clínica do AH, ou seja, funcionante ou não-funcionante. Na forma não-funcionante, as células tumorais não secretam hormônios ou os hormônios secretados não determinam manifestação clínica. Já na forma funcionante, as células neoplásicas secretam hormônios que determinam um quadro clínico conforme o tipo de hormônio produzido

Em 2017, a OMS atualizou os critérios de classificação dos AHs, adicionando a informação sobre a linhagem celular do tumor como um guia para sua categorização [3,4]. Desse modo, os fatores de transcrição assumiram uma posição relevante para o diagnóstico dos AHs [5]. Os principais são: fator de transcrição pituitário - específico positivo (PIT-1); fator de transcrição da família T-box (T-PIT), e o fator esteroideogênico 1 (SF-1). Assim, atualmente a classificação do tipo de AH se baseia no hormônio sintetizado pelo tumor e na expressão do fator de transcrição da linhagem celular neoplásica [5,6].

O grau de crescimento e de invasão tumoral podem ser determinados por meio de RMC e tomando por base as classificações de Knosp e de Hardy [7,8]. Particularmente, os maiores graus na classificação de Knosp (grau 3 ou 4) estariam associados a maior agressividade tumoral. Assim, um maior grau nesta classificação implicaria maior chance de ocorrência de lesão residual, e conseqüentemente, favoreceria a recidiva neoplásica [7,9,10,11]. Já a classificação de Hardy avalia a invasão tumoral selar e supra selar. Especificamente, tumores invasivos na classificação de Hardy são considerados como grau III ou IV [7,8].

Independentemente do comportamento/agressividade do AH, observa-se perda do padrão arquitetural normal da glândula. De fato, tal perda, evidenciada a partir da análise das fibras de reticulina, é critério para se estabelecer o diagnóstico histológico da lesão. Particularmente, o arranjo destas fibras confere à glândula sua

estrutura acinar normal. Por sua vez, o desenvolvimento do AH está associado ao desarranjo, afinamento e perda de fibras do arcabouço reticulínico [12,13,14].

Além das fibras de reticulina, pode-se analisar a estrutura do AH por meio do estudo das fibras colágenas. Estas últimas contribuem com a consistência tumoral, sendo que lesões fibroelásticas apresentaram mais fibras colágenas que adenomas amolecidos [15,16]. A consistência tumoral tem influência sobre sua ressecção cirúrgica.

No presente estudo, serão investigadas eventuais associações entre achados macroscópicos de neuroimagem, microscópicos e de imunomarcção em AHs tratados em centro de referência brasileiro e classificados conforme os critérios propostos pela OMS em 2017. A escassez de dados na literatura nacional e internacional sobre AHs classificados em função de tais critérios, bem como sobre as associações patológicas, radiológicas e clínicas que serão investigadas, justificam a presente investigação. Especificamente, serão considerados (i) os graus conforme as classificações de Knosp e Hardy e (ii) dados microscópicos relacionados à consistência tumoral (percentual de fibras reticulínicas e fibras colágenas), os quais podem influenciar na extensão de ressecção cirúrgica da lesão e, portanto, em sua recidiva. A hipótese é de que AHs com maiores graus nas classificações de Knosp e Hardy apresentam características microscópicas que se associam com consistência tumoral mais endurecida (principalmente maior percentual de fibras colágenas), comportamento local mais agressivo e pior prognóstico.

METODOLOGIA

Foram estudados 27 indivíduos (n=27) divididos em dois grupos: (i) controle, composto por 6 indivíduos (n=6) e (ii) casos de adenomas hipofisários, composto por 21 indivíduos (n=21). Como controle, foram utilizadas amostras da hipófise de indivíduos adultos submetidos a necropsia no HC/Unicamp e sem histórico de AHs. O material dos AHs foi obtido a partir de casos de indivíduos tratados no HC/Unicamp, tendo sido submetidos à cirurgia e ressecção do material tumoral. Os cortes histológicos obtidos foram corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de Masson (TM) e reticulina.

Em relação ao grupo de AHs, foram avaliados os prontuários médicos de pacientes de ambos os sexos com esse diagnóstico que foram operados no HC/Unicamp no período de janeiro de 2012 a março de 2022. Foram tabelados os dados clínicos (sexo, idade ao ser realizada a abordagem operatória), classificações de Knosp e Hardy, em função dos dados radiológicos, e achados histopatológicos (incluindo as classificações da OMS de 2017 e 2021).

A partir disso, foram separados espécimes representativos de material dos pacientes selecionados. As lâminas advindas do arquivo do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp foram processadas por protocolos padronizados. Posteriormente a isso, foi realizada a identificação dos tipos de AH por meio de imunomarcção, de acordo com as classificações da OMS de 2017 e de 2021.

Na etapa seguinte, essas lâminas foram escaneadas e digitalizadas. Usamos o software ImageJ® para realizar a captura de imagens representativas de 10 campos histológicos aleatórios nas lâminas digitais. Capturamos campos histológicos correspondentes em amostras de colorações diferentes pertencentes ao mesmo indivíduo. Nas lâminas de Tricrômico de Masson foi feita a deconvolução das cores para evidenciar as fibras colágenas e nas lâminas de Reticulina foi feita uma filtragem de canal de cores para destacar as fibras almeçadas. O processamento dessas imagens foi feito por meio do plugin IHC Profiler, que gera um contraste binário (Thresholding) em preto e branco a partir das imagens coloridas. Nesse processo, o operador é responsável por calibrar as marcações do programa de modo que fiquem mais fiéis às imagens coloridas. A partir disso, é calculado um quociente de coloração que corresponde aos pixels positivos em relação ao total presente na imagem, que contempla a distribuição de positividade da amostra em porcentagem.

Os dados obtidos na etapa anterior foram tabelados e processados por meio de análise estatística. As variáveis categóricas, como dados clínicos, foram submetidas a uma análise descritiva com apresentação em tabelas de frequências, enquanto as variáveis contínuas foram analisadas segundo medidas de posição (como média e mediana) e dispersão. Para comparação de medidas contínuas entre 2 grupos, foi aplicado o teste de Mann-Whitney e, para 3 grupos, o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

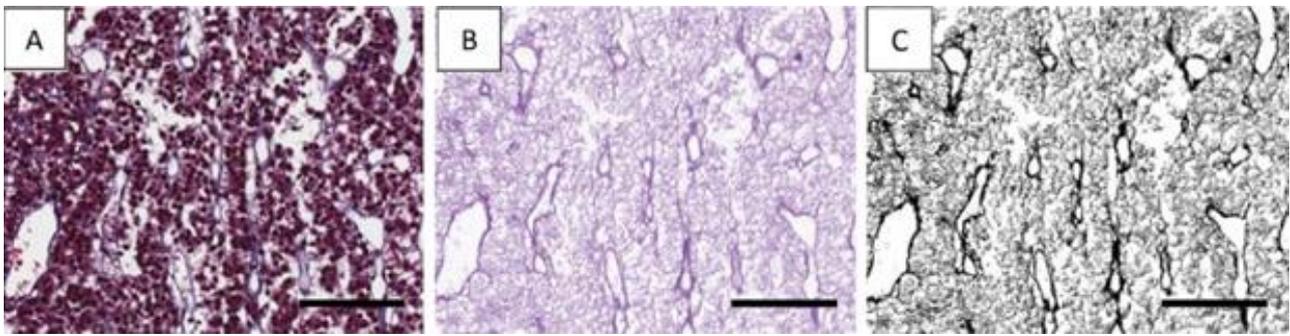


Figura 1: Campos histológicos representativos do processamento digital para análise das colorações por TM ou RET. Em A, corte corado pelo TM, no qual as fibras colágenas são destacadas em azul. Em B, imagem gerada a partir da deconvolução das cores observadas em A, com destaque para tons de azul. Em C, imagem obtida após o processamento (thresholding) a partir da imagem apresentada em B. A avaliação da marcação para RET seguiu os mesmos passos, com destaque para a cor preta, nas etapas ilustradas em B e C. Barra de escala: 100 μ m.

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP / Unicamp (CAAE: 58665322.2.0000.5404; número do parecer: 5.573.683).

RESULTADOS

Com relação aos dados clínicos, a maioria dos indivíduos na presente casuística foi do sexo masculino (63% do total). Considerando as idades nas quais os pacientes passaram pela cirurgia de ressecção tumoral, a média é de 49 anos (49.8 ± 14.4) (média \pm desvio-padrão).

Foram investigadas eventuais associações entre as classificações radiológicas (Knosp e Hardy) e dados histológicos dos AHs. Especificamente, ao comparar o percentil de fibras colágenas presentes nos diferentes graus de invasividade tumoral (alto e baixo grau) segundo a classificação de Knosp, não foi verificada diferença estatística ($p=0,4384$). O mesmo foi observado com relação aos graus de invasão na classificação de Knosp e o percentual de fibras reticulínicas ($p=0,9719$).

Na comparação entre os graus de invasão segundo a classificação de Hardy com o percentual de distribuição de positividade de fibras colágenas, também não se obteve significância estatística ($p=0,6127$). Isso também foi observado realizando a mesma análise com as fibras reticulínicas ($p=0,8016$), mostrando, portanto, que não existem diferenças entre a presença dessas fibras quando comparados diferentes graus de invasão tumoral.

Ao se analisar a percentagem de fibras colágenas, não foi observada diferença estatística entre os grupos controle e AH ($p=0,0662$). Por outro lado, a análise do percentual de fibras reticulínicas evidenciou diferença entre os dois grupos. Especificamente, foi observado valor médio maior no grupo controle (0.152 ± 0.015) (média \pm desvio-padrão) e menor no grupo AH (0.074 ± 0.018 ; $p=0,0003$) (média \pm desvio-padrão).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente estudo, a casuística foi constituída predominantemente por homens (63%). Este achado diverge de dados prévios da literatura, segundo os quais os AHs predominam em indivíduos do sexo feminino [1]. Uma possível explicação para tal divergência seria que a maioria dos AHs são do tipo lactotrófico, os quais têm como primeira escolha de tratamento a abordagem medicamentosa [17]. Como o material utilizado para a análise histológica do presente estudo é proveniente de espécimes obtidos em procedimentos cirúrgicos, os casos com tratamentos diferentes desta abordagem não integram a casuística aqui apresentada.

A média de idade da casuística do presente estudo entre os indivíduos com AHs foi de 49,8 anos. Essa média pode ser considerada elevada em relação a outras pesquisas feitas previamente sobre a epidemiologia dos AHs, que mostraram que a maioria desses tumores são diagnosticados mais

precocemente em mulheres jovens do que em homens, devido a alta prevalência de AHs lactotróficos (antes chamado de prolactinoma) em indivíduos do sexo feminino em idade fértil [18]. Esse fato justificaria a idade elevada relacionada a prevalência de indivíduos do sexo masculino.

Com relação as análises dos dados referentes a comparação da distribuição de positividade de fibras colágenas, não foi verificada diferença considerando-se os graus segundo as classificações de Knosp e Hardy. Isso também foi verificado em relação à distribuição de positividade das fibras reticulínicas em comparação com os graus de invasão das escalas citadas. Dessa forma, na presente casuística não foi verificada diferença estatística entre os grupos caracterizados por achados radiológicos indicativos de alto ou baixo grau de invasão local com relação aos dados microscópicos de constituição estrutural das lesões (percentual de fibras colágenas e reticulínicas).

Na literatura analisada, existem diversos estudos que buscam relacionar dados de Ressonância Magnética com a consistência tumoral a fim de estabelecer relações entre esses e usar o exame de imagem pré-operatório na previsão da firmeza do tumor, melhorando o planejamento cirúrgico. Entretanto, esses estudos avaliam as relações de variadas sequências de RM com a consistência tumoral determinada pelo cirurgião na retirada do tumor. O presente estudo se destaca por buscar relacionar classificações padronizadas de imagem com dados histopatológicos obtidos por métodos também padronizados, diminuindo assim o grau de subjetividade da avaliação da constituição tecidual da lesão. No entanto, diferentemente de dados encontrados que descreveram uma associação entre o percentual de distribuição de fibras colágenas e a tendência do tumor de se estender para o espaço supra selar [19], os resultados do presente estudo diferem disso. Uma possibilidade para tal é que o tamanho amostral utilizado é reduzido em relação ao número de indivíduos presentes no estudo supracitado.

No que tange a distribuição de positividade de fibras reticulínicas, foi notada diferença significativa entre os grupos AHs e controle. Considerando que o desenvolvimento do AH está associado ao desarranjo, afinamento e perda de fibras do arcabouço reticulínico [12,13,14], o presente estudo apresentou uma abordagem metodológica original para avaliação de fibras reticulínicas que evidencia de forma objetiva achados estruturais (arcabouço reticulínico) que caracterizam o AH, visto que não há na literatura médica outros estudos que descrevam essa relação.

Neste trabalho, foram comparados amostras de hipófise normal e AHs para avaliação de parâmetros estruturais dos tecidos e graus de invasão local das lesões conforme avaliação radiológica. Os resultados mostraram diminuição do percentual de fibras reticulínicas nos AHs em relação ao grupo controle (hipófise normal). No entanto, não foram verificadas diferenças entre as lesões com alto ou baixo grau de invasão local. A comunidade médica e científica especializada apresenta uma busca extensa por maneiras de obter dados estruturais dos AHs a partir de análise macroscópica radiológica. Dessa maneira, a presente pesquisa corrobora com esta busca, apresentando um método objetivo e original para a obtenção de dados de distribuição de positividade nas colorações histológicas e correlação radiológica.

BIBLIOGRAFIA

1. Lloyd, R. V. (eds) (2017) Who Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th ed. Lyon: IARC.
2. Trouillas J, Jaffrain-Rea ML, Vasiljevic A, Raverot G, Roncaroli F, Villa C. How to Classify the Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET)s in 2020. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 22;12(2):514. doi: 10.3390/cancers12020514. PMID: 32098443; PMCID: PMC7072139.
3. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: a summary. *Acta Neuropathol*. 2017 Oct;134(4):521-535. doi: 10.1007/s00401-017-1769-8. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28821944.
4. Mete O, Lopes MB. Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol*. 2017 Sep;28(3):228-243. doi: 10.1007/s12022-017-9498-z. PMID: 28766057.
5. Lake MG, Krook LS, Cruz SV. Pituitary adenomas: an overview. *Am Fam Physician*. 2013 Sep 1;88(5):319-27. PMID: 24010395.

6. Melmed S. Pituitary-Tumor Endocrinopathies. *N Engl J Med*. 2020 Mar 5;382(10):937-950. doi: 10.1056/NEJMra1810772. PMID: 32130815.
7. PMID: 25658782. 6. Rutkowski M, Zada G. Management of Pituitary Adenomas Invading the Cavernous Sinus. *Neurosurg Clin N Am*. 2019 Oct;30(4):445-455. doi: 10.1016/j.nec.2019.05.005. Epub 2019 Jul 16. PMID: 31471051. 7
8. Simsek Bagir, Gulay et al. "Knosp and Hardy Grading Systems are Useful in Predicting Persistence of Male Hypogonadism in Prolactinomas Following Prolactin Normalization." (2020) doi:10.25179/tjem.2020-77688
9. Micko AS, Wöhrer A, Wolfsberger S, Knosp E. Invasion of the cavernous sinus space in pituitary adenomas: endoscopic verification and its correlation with an MRI-based classification. *J Neurosurg*. 2015 Apr;122(4):803-11. doi: 10.3171/2014.12.JNS141083. Epub 2015 Feb
10. Dhandapani S, Singh H, Negm HM, Cohen S, Anand VK, Schwartz TH. Cavernous Sinus Invasion in Pituitary Adenomas: Systematic Review and Pooled Data Meta-Analysis of Radiologic Criteria and Comparison of Endoscopic and Microscopic Surgery. *World Neurosurg*. 2016 Dec;96:36-46. doi: 10.1016/j.wneu.2016.08.088. Epub 2016 Aug 30. PMID: 27591098.
11. Bonneville JF, Potorac J, Beckers A. Neuroimaging of aggressive pituitary tumors. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020 Jun;21(2):235-242. doi: 10.1007/s11154-020-09557-6. PMID: 32451879.
12. Placzek F, Micko A, Sentosa R, et al. Towards ultrahigh resolution OCT based endoscopical pituitary gland and adenoma screening: a performance parameter evaluation. *Biomed Opt Express*. 2020;11(12):7003-7018. Published 2020 Nov 9. doi:10.1364/BOE.409987
13. Catalino MP, Meredith DM, De Girolami U, Tavakol S, Min L, Laws ER. Corticotroph hyperplasia and Cushing disease: diagnostic features and surgical management. *J Neurosurg*. 2020 Sep 4:1-12. doi: 10.3171/2020.5.JNS201514. Epub ahead of print. PMID: 32886921.
14. Lin P, Liu X, Wang S, Li X, Song Y, Li L, Cai S, Wang X, Chen J. Diagnosing pituitary adenoma in unstained sections based on multiphoton microscopy. *Pituitary*. 2018 Aug;21(4):362-370. doi: 10.1007/s11102-018-0882-6. PMID: 29594837.
15. Yiping L, Ji X, Daoying G, Bo Y. Prediction of the consistency of pituitary adenoma: A comparative study on diffusion-weighted imaging and pathological results. *J Neuroradiol*. 2016 Jun;43(3):186-94. doi: 10.1016/j.neurad.2015.09.003. Epub 2015 Nov 14. PMID: 26585529.
16. Sanei Taheri M, Kimia F, Mehrnahad M, Saligheh Rad H, Haghhighatkhah H, Moradi A, Kazerooni AF, Alviri M, Absalan A. Accuracy of diffusion-weighted imaging-magnetic resonance in differentiating functional from non-functional pituitary macro adenoma and classification of tumor consistency. *Neuroradiol J*. 2019 Apr;32(2):74-85. doi: 10.1177/1971400918809825. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30501465; PMCID: PMC6410455.
17. Inder WJ, Jang C. Treatment of Prolactinoma. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Aug 13;58(8):1095. doi: 10.3390/medicina58081095. PMID: 36013562; PMCID: PMC9413135.
18. Daly AF, Beckers A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2020 Sep;49(3):347-355. doi: 10.1016/j.ecl.2020.04.002. Epub 2020 Jun 10. PMID: 32741475
19. Rutkowski, M. J., Chang, K., Cardinal, T., Du, R., Tafreshi, A. R., Donoho, D. A., Brunswick, A., Micko, A., Liu, C. J., Shiroishi, M. S., Carmichael, J. D., & Zada, G. (2021). Development and clinical validation of a grading system for pituitary adenoma consistency. *Journal of Neurosurgery JNS*, 134(6), 1800-1807. <https://doi.org/10.3171/2020.4.JNS193288>