

Ministerul Sănătății, Muncii și Protecției Sociale al Republicii Moldova
INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU"

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 616.432-006.55-074(043.2)

MELNIC EUGEN

PROFILUL HORMONAL ȘI MARKERI MOLECULARI
PREDICTIVI PENTRU EVOLUȚIA ȘI TERAPIA
ADENOAMELOR HIPOFIZARE

311.02 – ANATOMIA PATOLOGICĂ

Teză de doctor habilitat în științe medicale

Consultanți științifici:

Raica Marius

dr., profesor universitar, UMF
"Victor Babeș", Timișoara,
România

Șaptefrați Lilian

doctor habilitat în științe
medicale, conferențiar
universitar, 311.02- Anatomie
patologică,

Autor:

Melnic Eugen

doctor în științe medicale,
conferențiar universitar

CHIȘINĂU, 2018

© Melnic Eugen, 2018

CUPRINS

ADNOTARE	5
АННОТАЦИЯ	6
ANNOTATION.....	7
ABREVIERI	8
INTRODUCERE	11
1. REPERE MORFO-FUNCȚIONALE ALE HIPOFIZEI	26
1.1. Hipofiza: dezvoltare embriologică și histologie	26
1.2. Adenoamele hipofizare: histopatologie și profil molecular: controverse și certitudini.....	41
1.3. Factorii predictivi pentru diagnosticul și terapia adenoamelor hipofizare	52
1.4. Implicarea factorilor de creștere și a receptorilor corespondenți în patologia adenoamelor hipofizare.....	55
1.5. Concluzii la capitolul 1.....	66
2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE.....	67
2.1. Obiectul de studiu.....	67
2.2. Caracteristica generală a cercetării	69
2.3. Metode de cercetare.....	71
2.4. Analiza statistică.....	75
2.5. Concluzii la capitolul 2.....	81
3. ADENOAMELE HIPOFIZARE: HISTOPATOLOGIE ȘI PROFIL MOLECULAR.....	82
3.1. Evaluarea rezultatelor morfologice convenționale	82
3.2. Profilul hormonal identificat imunohistochimic: GH, prolactină, ACTH, TSH, FSH, LH	93
3.3. Concordanță morfologie-imunohistochimie.....	103
3.4. Concluzii la capitolul 3.....	108
4. FACTORII PREDICTIVI PENTRU DIAGNOSTICUL ȘI TERAPIA ADENOAMELOR HIPOFIZARE	109
4.1. Rata de proliferare a adenoamelor hipofizare.....	109
4.2. Expresia GFAP și a proteinei S100 în adenoamele hipofizare cu implicații în prognostic și terapie	114
4.3. Concluzii la capitolul 4.....	130

5. IMPLICAREA FACTORILOR DE CREȘTERE ȘI A RECEPTORILOR CORESPONDENȚI ÎN PATOLOGIA ADENOAMELOR HIPOFIZARE.....	131
5.1. Rolul factorilor de creștere VEGF, VEGF165b PDGF și a receptorilor corespondenți.....	131
5.1.1. VEGF-factorul de creștere al endoteliului vascular în patogeneza, evoluția și terapia adenoamelor hipofizare	131
5.1.2. VEGF165b în patogeneza adenoamelor hipofizare.....	140
5.1.3. PDGF A și axul PDGF B/PDGFRβ în adenoamele hipofizare	142
5.1.4. Axul PDGF B/PDGFR beta în adenoamele hipofizare	145
5.2. Expresia și semnificația prognostică a EG VEGF în adenoamele hipofizare	156
5.3. Proteina HER2 și EGFR.....	165
5.4. Concluzii la capitolul 5.....	182
6. DATE EPIDEMIOLOGICE ALE PROFILULUI HORMONAL ALE ADENOAMELOR HIPOFIZARE DIN REPUBLICA MOLDOVA STUDIATE COMPARATIV CU PROFILUL ADENOAMELOR HIPOFIZARE DIN ROMÂNIA	185
6.1. Variabilitatea comparativă a patenurilor de creștere și a profilului hormonal a adenoamelor hipofizare pe teritoriul Republicii Moldova și România	187
6.2. Concluzii la capitolul 6.....	192
CONCLUZII GENERALE.....	193
RECOMANDĂRI PRACTICE.....	195
PLANURI DE CERCETĂRI PENTRU VIITOR	196
BIBLIOGRAFIE	197
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	228
CURRICULUM VITAE	229

ADNOTARE

Melnic Eugen

PROFILUL HORMONAL ȘI MARKERI MOLECULARI PREDICTIVI PENTRU EVOLUȚIA ȘI TERAPIA ADENOAMELOR HIPOFIZARE

Teză de doctor habilitat în științe medicale

Localitatea și anul perfectării tezei: municipiul Chișinău, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", 2018.

Structura tezei: Lucrarea conține 196 pagini, cuprinde introducerea, 6 capitole, discuții pe marginea rezultatelor obținute, concluzii și bibliografie din 350 surse, 2 tabele, 95 figuri. Cu referire la tema tezei sunt editate 26 publicații științifice. **Cuvinte Cheie:** adenom hipofizar, patern de creștere, imunohistochimie, profil hormonal, prolactina, profil molecular, hibridizare, factor de creștere, factor de proliferare, arie geografică. **Domeniul de studii:** Anatomie patologică. **Scopul lucrării:** Studiul factorilor moleculari cu rol predictiv și probabil terapeutic abordați dependent de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. **Obiective:** Evaluarea completă a adenoamelor hipofizare prin metode histopatologice, realizarea profilului hormonal și confirmarea diagnosticului prin metode moleculare imunohistochimice. **Noutatea științifică a rezultatelor obținute:** Pentru prima dată a fost efectuat un studiu comparativ al profilului hormonal și markerii moleculari al adenoamelor hipofizare. Rata cazurilor de adenoame hipofizare mixte cu asocieri rare a fost superioară mediei întâlnite în literatura de specialitate. Acest aspect susține prezența unor factori etiopatogenici particulari zonei de unde provin adenoamele hipofizare. În premieră a fost estimat și corelat rolul receptorilor hormoni pituitari și factorii de proliferare. **Rezultatele principale noi pentru știință și practică:** S-a realizat în premiera o analiză a structurii adenoamelor hipofizare în dependență de aria geografică, fapt ce ar permite punerea în evidență a unor factori de mediu implicați în etiologia acestor tumori. **Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării:** Rezultatele privind stabilitatea receptorilor celulari vor duce la reevaluarea tacticii de diagnostic și tratament în practica neuroterapeutică, indicând necesitatea obligatorie de studiere imunohistochimică a adenoamelor hipofizare. Stabilirea diagnosticului complet are un impact pronostic și terapeutic enorm, eficientizând terapia antitumorală specifică și permițând efectuarea unui tratament personalizat în adenoamele pituitare. **Implementarea în practică:** Rezultatele obținute sunt implementate în tratamentul personalizat și determinarea managementului și factorilor de pronostic a pacienților diagnosticați cu adenom hipofizar în neurochirurgie și endocrinologie.

АННОТАЦИЯ

Мельник Евгений

ГОРМОНАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ЭВОЛЮЦИИ И ТЕРАПИИ АДЕНОМЫ ГИПОФИЗА

Диссертация доктора хабилитат медицинских наук

Город и год защиты диссертации: Кишинэу, Государственный Университет Медицины и Фармации «Николае Тестемицану», 2018 год.

Структура диссертации: Диссертация содержит 196 страниц, введение, 6 глав, заключение и 350 источника библиографии, 2 таблицы, 95 рисунков. По тематике диссертации опубликованы 26 научных статей. **Ключевые слова:** аденома гипофиза, паттерн роста, иммуногистохимия, гормональный профиль, пролактин, молекулярный профиль, гибридизация, эпидермальный фактор роста, фактор пролиферации, географическая зона. **Область исследования:** Патологическая анатомия. **Цель работы:** Изучение молекулярных факторов с прогностической и, вероятно, терапевтической ролью в зависимости от гормонального профиля аденомы гипофиза. **Задачи исследования:** Полномасштабная оценка аденом гипофиза с помощью гистологических методов, гормональное профилирование и иммуногистохимическое подтверждение диагноза при использовании молекулярных методов. **Научная новизна и оригинальность:** впервые было проведено сравнительное исследование гормонального профиля и молекулярных маркеров аденом гипофиза. Частота редко ассоциирующихся смешанных аденом гипофиза выше среднего встречающегося в литературе. Впервые была оценена и коррелирована роль гормональных рецепторов гипофиза и факторов пролиферации. **Основные результаты для науки и практики:** впервые была проведена оценка аденом гипофиза в зависимости от географической зоны, что позволило бы выделить экологические факторы, вовлечённые в этиологию этих опухолей. **Теоретическая значимость и ценность работы:** Выводы о стабильности клеточных рецепторов, приведут к пересмотру тактики диагностики и лечения в нейро-терапевтической практике, что указывает на необходимость иммуногистохимического исследования аденом гипофиза. **Внедрение в практику результатов исследования:** Полученные результаты могут быть внедрены в персонализированное лечение, определение менеджмента и прогностических факторов у больных с диагнозом аденом гипофиза в нейрохирургии и эндокринологии.

ANNOTATION

Melnic Eugen

HORMONAL PROFILE AND PREDICTIVE MOLECULAR MARKERS FOR THE DEVELOPMENT AND THERAPY OF PITUITARY ADENOMAS

PhD thesis in medicine

Place and year of thesis completion: State University of Medicine and Pharmacy “Nicolae Testemitanu”, Chisinau, 2018.

Thesis structure: It contains 196 pages, introduction, six chapters, conclusions, 350 sources of bibliography, 2 tables 95 figures. Twenty-six scientific papers related to the topic of the thesis have been published so far. **Keywords:** pituitary adenoma, growth pattern, immunohistochemistry, hormonal profile, prolactin, molecular profile, hybridization, epidermal growth factor, proliferation factor, geographical area. **Field of study:** Pathology. **The aim of the work:** The revision of the molecular factors that have a predictive and probably therapeutic role depending on the pituitary adenoma hormonal status. **Objectives:** Full assessment of pituitary adenomas by histopathological methods, hormonal profiling and immunohistochemical confirmation of the diagnosis by molecular methods. **Scientific innovation of the obtained results:** A comparative study of hormonal profile and molecular markers of pituitary adenomas has been performed for the first time. The rate of the mixed pituitary adenoma cases of a rare combination was higher than the average one mentioned in specialized literature. This confirms the presence of some etiopathogenic factors typical of the area from where the pituitary adenomas come. The role of pituitary hormone receptors and proliferation factors has been estimated and correlated for the first time. **The new key results for science and practice:** For the first time an analysis of the structure of pituitary adenomas depending on the geographical area was done; this would allow the recording of environmental factors involved in the etiology of these tumors. **Theoretical significance and applicative value of the work:** The results regarding the cellular receptors stability will lead to the re-evaluation of diagnostic and treatment tactics in the neuro-therapeutic practice, indicating the mandatory need for an immunohistochemical study of pituitary adenomas. The complete diagnosis has a great prognostic and therapeutic impact streamlining the specific customized tumor therapy of pituitary adenomas. **Practical implementation:** The obtained results are implemented in the personalized treatment and used for determining the management and the prognostic factors in patients diagnosed with pituitary adenoma in neurosurgery and endocrinology.

ABREVIERI

11q13 - lanțul Q13 al cromozomului 11

ACTH - hormon adrenocorticotropic

ADH - hormon antidiuretic

AKT - protein-kinaza serin/terozin specifică

ANOVA - analiza variabilității

Arg201His - Argirina 201Histidina

bcl-2 - proteină reglatoare a apoptozei

bFGF -factor de bază de creștere a fibroblastelor

Bmil - laborator de bioinginerie medicală

CD31 - molecula de adeziune a celulelor endoteliale plachetare

CD34 - antigen a celulelor precursorare hematopoietice

c-Myc - gena reglatoare care codifică factorul de transcriere

COX-2 - prostaglandin-endoperoxid sintaza

CRH - hormon de eliberare a corticotropinei

EG VEGF - derivat al glandei endocrine factorul de creștere endotelial vascular

EGF - factor epidermal de creștere

EGFR - receptorul factorului de creștere epidermal

EMA - antigen membranar epitelial

Eps8 - factorului 8 epidermal de creștere substrat al receptorului kinazei

ErbB2 - receptor tirozin-protein kinazic (CD340)

ER - epiregulină

ERK - kinaza extracelulară semnal-reglatoare

FGF-2 - factor de creștere a fibroblastelor

FSH - hormon foliculostimulant

fT4 - tiroxina liberă

GFAP - proteina acidă glială fibrilară

GH - hormon de creștere uman

GHRH - receptorul hormonului uman de creștere

GLUT-1 - proteina transportatoare de glucoză

GNAS - proteina guanin nucleotid alfa stimulative

HER2 - receptorul factorului de creștere epidermal
HER4 - receptori tirozin-protein kinazici (ErbB4)
HIF - factori induși de hipoxie
H-ras - enzimă proteică transformatoare p21
HRG - hereguline
IGF-1 - factor de creștere insulin-like 1
IHC - imunohistochimie
KDR - receptor al domeniului de inserție chinazică
Ki67 - marker proteic a proliferării celulare
LH - hormon luteinizant
MAPK - protein kinaza mitogen activatoare
ME - metaloproteinaza
MEN - sindrom neoplazic endocrin
MMP - metaloproteinaze de matrice
MSH - hormon melanostimulator
MVD - densitatea vasculară medie
NR - neureguline
OMS - organizația mondială a sănătății
PAI-1 - inhibitor al activatorului plasminogenic endotelial
PCNA - antigen nuclear de proliferare celulară
PDGF - factor de creștere derivat din plachete
PDGFRs - receptorul factorului de creștere derivat plachetar
PDGFR β - receptorul factorului de creștere derivat din trombocite tip Beta
PI3K - fosfatidilinositide 3-kinaza
PIGF - factorul de creștere placentar
POMC - proopiomelanocortinul
PRL - prolactina
PTTG - gena de transformare tumorală a hipofizei
RB - retinoblastom
RE - reticol endoplasmatic
RER - reticol endoplasmatic rugos
RNA - acid ribonucleic
RT-PCR - transcripția inversă a reacției de polimerizare în lanț

S100 - proteină cu densitate moleculară joasă

Sap-1 - standard de aplicare

STH - hormon somatotrof

TGF- α - factor transformator de creștere alfa

TMAAs - tehnica de microarray tisular

Top - topoisomeraza

TP53 - gena de supresie tumorală

t-PA - activator al plasminogenului tisular

TSH - hormon stimulator tiroidian

UEA1 - lectina ulex europaeus aglutinina 1

VEGF - factorul de creștere endotelial vascular

WB - western Blot

α -SU - hormon glicoproteic al subunității alfa

INTRODUCERE

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 ale 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. Acestea 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 [78].

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 post-mortem și de 22,2% în studiile radiologice [236]. 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 [213].

Comparativ, tumorile primare ale neurohipofizei sunt rare și în general, sunt similare cu tumorile primare ale sistemului nervos central, dar reprezintă localizarea cea mai frecventă a metastazelor. Pe lângă tumori, o varietate de leziuni non-neoplastice pot afecta glanda pituitara, creând o serie de dificultăți în diagnosticul diferențial al tumorilor care implică această regiune [179].

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 [255].

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 țesutului hipofizar, precum și o posibilă sursă de proliferare monoclonală pe un micromediu și un teren genetic modificat [175].

O bună parte din aceste tumori sunt “silenzioase”, subclinice, nefiind operate niciodată de

neurochirurg, de aceea este foarte important sa diferențiem incidentaloamele, care nu necesită tratament, de adenoamele hipofizare, care implică un diagnostic corect și o atitudine terapeutică, fie ea farmacologică, radioterapeutică sau chirurgicală [242].

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

Caracterizarea moleculară a adenoamelor hipofizare, extrem de necesară pentru identificarea factorilor cu 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 înaltă comparativ cu precedentele cu efecte nefavorabile asupra profilului endocrin al întregului organism, nu au fost complet caracterizate din punct de vedere molecular [128].

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 consemneze 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.

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 OMS 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. Datorită lipsei standardizării protocoalelor de evaluare și terapie, rata de recurență a unor tipuri de adenoame hipofizare în special a celor secretante de prolactină este foarte înaltă.

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.

Totodată, diagnosticul histopatologic a evidențiat predominanța unor tipuri histopatologice particulare în zona Republicii Moldova, aspect care, pentru această zonă este important din punct de vedere epidemiologic. Mai mult decât atât, prezentul studiu, este primul de acest gen în Republica Moldova și, în plus, nu există date epidemiologice care să caracterizeze adenoamele hipofizare din această arie geografică. Importanța diagnosticului histopatologic rezultă și din capitolul de concordanță morfologică și imunohistochimică, care prezintă detalii semnificative privind corelația dintre pattern-ul de creștere și predominanța 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 lucrări. Tipurile de adenoame hipofizare pure, par să aibă un profil imunohistochimic aparte în Republica Moldova prin predominanța adenoamelor hipofizare pure LH secretante. Acest aspect deschide o nouă pistă de cercetare în domeniul adenoamelor hipofizare pentru această arie geografică, respectiv și o nouă direcție pentru adenoamele non funcționale care, inițial se consideră că ar fi FSH și LH secretante. 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 imprevizibilă, 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 distincte de încadrare clinică și terapeutică dependente de profilul hormonal. Două aspecte particulare au guvernat adenoamele plurihormonale din actualul 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. În baza acestor observații și a cercetărilor precedente asupra adenoamelor hipofizare provenite din zona de sud și 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 predominanța unui 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. 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 VEGF sau EGFR există date puține în literatura de specialitate, despre alți factori cum ar fi oncoproteina HER2 sau factorul de creștere derivat din plachete (PDGF A, B și receptorii corespondenți), aceștia în general nu sunt studiați pe țesuturi umane ci doar în modele experimentale. Este paradoxal că 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 prezenței 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 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 neoformație din aria tumorală. Acest aspect sugerează că inhibarea vaselor tumorale include nu doar un singur factor ci o etiologie complexă, concurentă pentru realizarea acestui paradox care caracterizează 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, drept inhibitori 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, potențarea reciprocă a sintezei și acțiunii autocrine sau paracrine. Rata de proliferare a adenoamelor hipofizare pentru Ki67a 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. 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 elucidat, este studiul proteinei S100 și a proteinei gliale fibrilare acide, nu doar la nivelul celulelor foliculare stelate dar și în celulele tumorale ale adenoamelor hipofizare. Dacă până în prezent, majoritatea studiilor sunt focusate pe celulele foliculostelate care este știut că exprimă GFAP și proteina S100, prezentul studiu a încercat să asocieze expresia acestor doi markeri în celulele tumorale cu factorii de creștere actualmente studiați. Principala concluzie care a rezultat din acest studiu a fost că expresia GFAP și proteinei S100 în celulele tumorale este implicată 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 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. O atenție deosebită, din punct de vedere al studiului factorilor de creștere și celorlalți parametri incluși în prezentul material se oferă adenoamelor hipofizare care secretă ACTH sau care au asociat ACTH. 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. 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 patogeneza adenoamelor hipofizare.

Continuarea cercetării multicentrice inițiate în cadrul studiului de față este obligatorie pentru zona de est și sud est a Europei, cât și pentru toată aria Republicii Moldova. Heterogenitatea 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.

Scopul lucrării:

Studiul factorilor moleculari cu rol predictiv și terapeutic abordați dependent de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Caracteristica histopatologică, imunohistochimică și moleculară a adenoamelor hipofizare din Republica Moldova pentru identificarea unor factori noi de prognostic și a unor ținte terapeutice personalizate.

Obiectivele lucrării:

1. Evaluarea spectrului histopatologic al adenoamelor hipofizare din zona Republicii Moldova.
2. Realizarea profilului hormonal al adenoamelor hipofizare prin utilizarea imunohistochimiei pentru GH, prolactină, TSH, ACTH, FSH, LH.
3. Studiul concordanței diagnostice dintre aspectele imunohistochimice și histopatologie.
4. Identificarea rolului factorilor de creștere în patogeneza adenoamelor hipofizare.
5. Influența profilului hormonal asupra ratei de proliferare a adenoamelor hipofizare.
6. Studiul proteinei HER2 și a EGFR în raport cu profilul hormonal al adenoamelor hipofizare incluse în studiu.
7. Rolul proteinei S100 și a GFAP în prognosticul adenoamelor hipofizare.
8. Rolul hibridizării in situ în îmbunătățirea diagnosticului molecular al adenoamelor hipofizare.
9. Stabilirea unui protocol de evaluare diagnostică a adenoamelor hipofizare care să includă parametrii histopatologici, imunohistochimici și moleculari cu potențial impact prognostic și terapeutic.

Suportul metodologic:

Gama largă a ratelor de incidență în cadrul studiilor individuale sugerează că există numeroși factori de risc responsabili de dezvoltarea tumorilor hipofizare, sau că tumorile sunt operabile la diferite etape de monitoring. Este bine stabilit faptul că adenoamele hipofizare apar

din expansiunea clonală a celulelor somatice mutante, dar mecanismul cauzal implicat în tumorigeneză rămâne a fi stabilit. Unele gene specifice par să predisună la formarea tumorii hipofizare, în timp ce oncogenele nu joacă un rol în formarea tumorilor hipofizare. Am folosit o resursă cuprinzătoare, bazată pe populație, pentru a examina diferențele demografice ale ratelor de incidență pentru adenoamele hipofizare. Din câte cunoaștem, aceasta este prima dată când baza de date a fost utilizată pentru a examina demografia adenoamelor hipofizare în Republica Moldova și România.

Sportul metodologic și teoretico-științific al acestui studiu au servit investigațiile fundamentale ale profesorilor Marius Raica, Anca-Maria Cîmpean, și Mihail Coculescu cu discipolii săi, care au acordat o deosebită atenție hipofizei umane în special evoluției tumorilor hipofizare.

Analiza surselor de referință a patologilor Shao S., Li X. "Clinical features and analysis in 1385 Chinese patients with pituitary adenomas" (2013); și Ryosuke Mori "Clinicopathological Features of Growth Hormone-Producing Pituitary Adenomas in 242 Acromegaly Patients: Classification according to Hormone Production and Cytokeratin Distribution." (2013) au servit drept suport practico-științific, iar cercetările lui Bălinișteanu B, Cîmpean AM, Coculescu M, Raica M. "Conventional examination versus immunohistochemistry in the prediction of hormone profile of pituitary adenomas. An analysis on 142 cases." (2011) au fost un reper teoretico-științific.

Rezultatele principale noi pentru știință și practică:

S-a realizat în premiera o analiză a structurii adenoamelor hipofizare în dependență de aria geografică, fapt ce ar permite punerea în evidență a unor factori de mediu implicați în etiologia acestor tumori. Am determinat punctul posibil de prodrom al dezvoltării adenoamelor hipofizare și anume celulele foliculostelate, care sunt cunoscute drept celule-stem hipofizare.

Noutatea științifică a rezultatelor obținute:

Pentru prima dată a fost efectuat un studiu comparativ al profilului hormonal și markerii moleculari al adenoamelor hipofizare. Rata cazurilor de adenoame hipofizare mixte cu asocieri rare a fost superioară mediei întâlnite în literatura de specialitate. Acest aspect susține prezența unor factor etiopatogenici particulari zonei de unde provin adenoamele hipofizare. În premieră a fost estimat și corelat rolul receptorilor hormoni pituitari și factorii de proliferare. Am detectat cel puțin 3 factori cu potențial rol de pronostic și tratament în adenoamele hipofizare.

Principiile de bază prezentate pentru susținere

- Evaluarea complexă a tabloului morfologic și a profilului hormonal al adenoamelor hipofizare din punct de vedere aplicativ.
- Relevarea noilor aspecte cu privire la structura geografică în corelare cu cea morfologică a adenoamelor hipofizare în vederea determinării unor posibili factori inițiatori de mediu.
- Relevarea unor aspecte noi în clasificarea morfologică și imunohistochimică a adenoamelor hipofizare.
- Argumentarea recomandărilor pentru modificarea principiilor de diagnostic și tratament a adenoamelor hipofizare.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării:

Rezultatele privind stabilitatea receptorilor celulari vor duce la reevaluarea tacticii de diagnostic și tratament în practica neuro-terapeutică, indicând necesitatea obligatorie de studiere imunohistochimică a adenoamelor hipofizare. Stabilirea diagnosticului complet are un impact pronostic și terapeutic enorm, eficientizând terapia antitumorală specifică și permițând efectuarea unui tratament personalizat în adenoamele pituitare. Asocieri triple sau cvadruple identificate excepțional în lotul din Republica Moldova, ca fiind de o frecvență mai mare au completat profilul adenoamelor hipofizare. Diferențele menționate în lucrarea prezentă, generează întrebări cu privire la prezența unor factori etiologici sau epidemiologici regionali care pot să influențeze imunoprofilul adenoamelor hipofizare, care ar putea fi urmate de:

- Elaborarea unei noi tactici de diagnostic tratament a maladiilor hipofizare.
- Editarea ghidurilor și manualelor pentru studenți, rezidenți ai USMF "N.Testemițanu" și medici practici în cadrul educației medicale continue.
- Implementarea în practica neurologică, neurochirurgicală și endocrinologică.

Am stabilit profilului molecular în diferite patternuri de creștere de adenoame hipofizare și în mod special prin utilizarea anticorpilor monoclonali înalt specializați a fost posibilă stabilirea variantelor plurihormonale de adenoame hipofizare. Am stabilit particularitățile imunohistochimice a asocierilor hormonale extrem de rare (ACTH LH; TSH FSH). De asemenea am ajuns la concluzia că cel mai eficient marker predictiv tumoral rămâne a fi clasificarea bazată pe conținutul hormonal și morfologia celulară.

Implementarea în practică:

Rezultatele obținute pot fi implementate în tratamentul personalizat și determinarea managementului și factorilor de pronostic a pacienților diagnosticați cu adenom hipofizar în cadrul secției de endocrinologie a Spitalului Clinic Republican; secțiilor de neurochirurgie și neurochirurgie oncologică. S-au obținut noi acte de implementare a rezultatelor de investigație științifice.

Rezultatele științifice noi

1. Am argumentat histologic, imunohistochimic și molecular incidența adenoamelor hipofizare în Republica Moldova în comparație cu alte țări Europene și SUA.
2. Am stabilit profilul molecular în diferite patternuri de creștere de adenome hipofizare și în mod special prin utilizarea anticorpilor monoclonali înalt specializați a fost posibilă stabilirea variantelor plurihormonale de adenome hipofizare. Am stabilit particularitățile imunohistochimice a asocierilor hormonale extrem de rare (ACTH LH; TSH FSH).
3. Am stabilit factorii moleculari predictivi pentru evoluția, diagnosticul și tratamentul tumorilor hipofizare (VEGF, PDGF, EGFR, GFAP, proteina S100, Ki67).

Aprobarea rezultatelor

Rezultatele obținute pe parcursul investigațiilor efectuate și concepțiile de bază ale tezei au fost comunicate și discutate în cadrul următoarelor reuniuni științifice:

1. A noua conferință internațională de patologie Anticancer research, Sithonia, Grecia, 2014.
2. Virchows Archiv. Al 27 European Congress of Pathology, Belgrade, Serbia, 2015.
3. Prima conferință euroregională a doctoranzilor și tinerilor cercetători în domeniul biomedicinii. Timisoara, Romania, 2015.
4. Acta medica. Marisiensis al 14 National Symposium of Microscopic Morphology Târgu Mureș. Romania. 2016, p. 20.
5. Acta Endocrinologica. Common Congress of the Romanian Society of Endocrinology and Romanian Psychoneuroendocrine Society, Brașov, Romania, 2016.
6. Virchows Archiv. European Journal of Pathology, Koln, Germany 2016.
7. 19-th European Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal, 2017.

Publicații la temă

În baza tezei au fost publicate 1 monografie, 16 lucrări științifice, 9 teze internaționale, 6 fără coautori, 17 în străinătate.

Sumarul compartimentelor de bază

Teza cu tema „Adenoamele hipofizare. Morfopatologie și profil molecular” este consacrată profilului hormonal și markerilor moleculari prognostici în evoluția și terapia adenoamelor hipofizare. În lucrare am făcut o sinteză a diferitelor aspecte ale problemei examinate, reflectate în literatura națională și internațională, ce vizează profilul hormonal și molecular a adenoamelor hipofizare.

Teza este expusă pe 196 pagini și cuprinde rezumatele în limbile română, rusă și engleză, lista de abrevieri, introducere, 6 capitole de cercetări proprii, sinteza rezultatelor obținute, concluzii generale și recomandări practice, 2 tabele, 95 figuri. Bibliografia include 350 de surse.

Teza conține 6 capitole. Capitolul **introdactiv** pune în evidență importanța actualului studiu pentru medicina practică și științifică. Tematica abordată este de actualitate și vine să completeze lipsa de informație din literatura de specialitate referitoare la profilul hormonal și markerii moleculari predictivi pentru evoluția și tratamentul adenoamelor hipofizare. În acest compartiment sunt formulate scopul și obiectivele tezei, de asemenea, sunt prezentate noutatea științifică a rezultatelor cercetării, importanța teoretică și practică a informației acumulate și analizate. Sunt descrise principiile de bază promovate pentru susținere.

Drept imbold pentru efectuarea acestui studiu complex a servit lipsa publicațiilor referitoare la tiparele morfologice și profilului hormonal a adenoamelor hipofizare pe teritoriul Republicii Moldova. Un motiv esențial a fost dorința de a contribui la soluționarea problemelor stringente ale medicinei practice.

Capitolul I Repere morfo-funcționale ale hipofizei, reprezintă revista literaturii și conține date despre structura anatomo-histologică a hipofizei umane prin prisma noilor date de laborator. Aspectele histologice ale hipofizei normale sunt de cele mai multe ori studiate pe secțiuni histologice provenite de la alte specii și, într-o foarte mică măsură sunt descrise în literatură aspectele morfologice, celulare și moleculare ale hipofizei normale. Aceasta derivă din faptul că, țesutul hipofizar normal poate fi colectat autopsic în principal și, într-o mai mică măsură în urma intervențiilor chirurgicale pentru terapia adenoamelor hipofizare. Un număr de variații normale histologice a glandei hipofizare pot mima leziuni histopatologice.

Capitolul II Material și metode de cercetare. Pentru studiul de față am investigat 96 de

cazuri (10 hipofize normale, obținute în timpul necropsiilor și 86 de cazuri diagnosticate cu adenom hipofizar, aflate în diferite stadii de evoluție clinică). Pacienții au fost internați la Centrul Științifico-Practic de Neurologie și Neurochirurgie al Spitalului Clinic Republican Moldova.

Biopsiile obținute au fost spălate în ser fiziologic, fixate în formalină tamponată la pH7.2 timp de 48-72 de ore, și incluzionate în parafină, după tehnica histologică uzuală, folosind sistemul automatizat și standardizat Thermo Shandon. Procesarea țesuturilor s-a efectuat prin deshidratare cu ajutorul soluțiilor de alcool, clarifiere în benzen și incluzionare în parafină. Pentru a minimaliza denaturarea antigenilor, țesuturile nu s-au expus la temperaturi mai mari de 60°C în cursul incluzionării în parafină. S-a efectuat apoi secționare seriată la microtom (Shandon ME) (15 secțiuni/bloc, cu grosimea de 3 micrometri) pentru diagnosticul primar. Secțiunile au fost montate pe lame silanate plasate la termostat la 60°C timp de 60 de minute, apoi la 37°C timp de 24 de ore, pentru a asigura adeziunea secțiunilor la lame.

Metoda morfologică a fost constituită din colorarea lamelor cu hematoxilină-eozină: lamele au fost imersionate în hematoxilină. Pe baza colorației morfologice, s-a stabilit diagnosticul histopatologic de adenom hipofizar conform clasificării WHO.

Metodele imunohistochimice permit vizualizarea antigenelor proteice tisulare sau celulare. Se bazează pe imunoreactivitatea anticorpilor și proprietățile chimice ale enzimelor sau complexelor enzimatică care reacționează cu substraturi cromogenice necolorate, pentru a produce compuși finali colorați.

S-au utilizat următoarele metode imunohistochimice, pentru fiecare hormon în parte:

- STH - S-au utilizat anticorpi anti- GH (DakoCytomation, diluție 1: 400).
- PRL - S-au utilizat anticorpi anti- PRL (DakoCytomation, diluție 1: 250).
- TSH - S-au utilizat anticorpi anti- TSH (DakoCytomation, clona 0042, diluție 1: 50).
- FSH - S-au utilizat anticorpi anti- FSH (DakoCytomation, clona C10, diluție 1: 50).
- LH - S-au utilizat anticorpi anti- LH (DakoCytomation, clona C93, diluție 1: 50).
- ACTH - S-au utilizat anticorpi anti- ACTH (DakoCytomation, clona C93, diluție 1:5).
- Pentru punerea în evidență a indexului de proliferare Ki67 s-a folosit tehnica imunohistochimică cu anticorpi direcți împotriva MIB-1.
- Imunohistochimia pentru identificarea expresiei proteinei HER2 a utilizat sistemul automat de detecție ORACLE de la Leica, sistem complet standardizat. Același protocol standardizat s-a aplicat și pentru EGFR.

- VEGF, clona VG1, diluție 1:25 a provenit de la Reliatech (Germania), la fel ca FGF2, podoplanina, clona D2-40. PDGF A și PDGF B au fost achiziționați de la Santa Cruz Biotechnology (USA).
- Hibridizare in situ pentru identificarea RNA și DNA pe secțiuni la parafină.

Metodologia studiului

Examinarea și analiza imaginilor microscopice. Examinarea s-a efectuat cu ajutorul microscopului optic Nikon Eclipse600, imaginile fiind preluate cu ajutorul camerei digitale Coolpix950. Analiza imaginii microscopice s-a efectuat cu programul LuciaNet (Nikon), pe imagini achiziționate JPEG, la calibrare x400. Analiza imaginii s-a efectuat după metoda hot-spot, alegându-se câmpurile microscopice cu densitate maximă a semnalelor pozitive.

Evaluarea imunoreactivității hormonilor hipofizari a fost făcută astfel: densitate sub 5%=0, între 5-10%= +1, între 10-50%= +2, valori între 50-100% = +3; de asemenea s-a evaluat și intensitatea reacției; 0 – (+1) adenoame nesecretante; +2 - +3 adenoame secretante.

Evaluarea indicelui de proliferare Ki67 s-a efectuat cu ajutorul unui microscop Nikon Eclipse E600, la o mărire de 400X, asistat de un program computerizat specializat în numărarea celulelor (NSI). S-au evaluat zonele cu cea mai mare imunoreactivitate, fiind evaluate în medie 1000 de celule per caz (aproximativ 3 câmpuri microscopice preluate ca imagini multimedia).

Pentru aprecierea reacției pozitive a factorilor de creștere investigați, am aplicat un scor bazat pe incidența celulelor pozitive asociat cu intensitatea produsului final de reacție. La cazurile pozitive scorul a fost cuprins între 2 și 6. Scorul utilizat în aceste condiții (evaluarea expresiei VEGF și PDGF) este redat în tabelul de mai jos.

Analiza statistică. Analiza statistică s-a realizat folosind software-ul SPSS, versiunea 13. Metodele statistice au inclus trei teste de corelație (testele Spearman, Kendall, și Pearson). O corelație semnificativă a fost luată în considerare pentru o valoare a $p < 0.05$.

Capitolul III Adenoamele hipofizare: histopatologie și profilul molecular cuprinde examenul histopatologic clasic care se completează ulterior cu examen imunohistochimic al preparatului prelucrat la parafină. De la prima clasificare morfologică propusă de Cushing în 1912 și până în prezent, clasificările adenoamelor hipofizare au urmărit să combine aspectele morfologice ale tumorilor cu aspectele clinico-endocrinologice prezentate de pacient. Cu ajutorul tehnicilor moderne de diagnostic a tumorilor, a corelației dintre activitatea endocrină și aspectele morfologice, profilului imunohistochimic, aspectelor ultrastructurale, au fost obținute o serie de

progrese în înțelegerea biologiei și patogeniei tumorilor adenohipofizare. Clasificarea clinico/morfologică folosită în prezent de multe laboratoare, nu numai că ne ajută să înțelegem citogeneza adenoamelor, ci să identificăm diferitele tipuri tumorale care pot prezenta clinic o simptomatologie similară. Datorită investigațiilor considerabile care s-au efectuat, se cunosc într-o mică măsură mecanismele implicate în tumorigeneza și evoluția tumorală a adenoamelor. Dezvoltarea adenoamelor hipofizare pare a fi un proces multistadial și multicausal în care factori endocrini, predispoziția genetică și mutațiile somatice specifice pot servi ca factori contributivi. Evaluarea inițială, bazată pe criterii morfologice este obligatoriu de a fi completată de un profil hormonal cât mai bine certificat. Din acest motiv, în prezent diagnosticul adenoamelor hipofizare combină aspectele histopatologice cu profilul hormonal, foarte util mai ales în cazul adenoamelor plurihormonale.

O importanță majoră o are **IV și V** al tezei care permite modificarea radicală a tratamentului și conduitei pacienților cu astfel de diagnostic. Acestea implică **Factorii predictivi pentru diagnosticul și terapia adenoamelor hipofizare cu implicare factorilor de creștere și a receptorilor corespunzător în patologia adenoamelor hipofizare**. Personalizarea tratamentului este una din pârgurile de bază care poate da rezultate favorabile în dinamică. Capacitatea de predicție a potențialului proliferativ al adenoamelor hipofizare ar putea avea implicații majore în managementul clinic al adenoamelor hipofizare. Literatura de specialitate a fost axată pe identificarea factorilor predictivi de comportament al adenoamelor hipofizare. Indexul de proliferare pentru Ki67 a fost demonstrat ca fiind o unealtă utilă în măsurarea proliferării tisulare și, din acest motiv, a fost studiat extensiv. Expresia GFAP și a proteinei S100 a fost studiată în adenoamele hipofizare, fiind frecvent asociată cu celulele foliculostelate. Expresia lor în celulele tumorale, cuantificată separat în variatele tipuri de adenoame hipofizare reprezintă un subiect sporadic în literatură și, din acest motiv, corelațiile cu prognosticul, supraviețuirea pe termen lung, recidivele și implicațiile terapeutice sunt extrem de neconvingătoare în prezent. Date din ce în ce mai numeroase sugerează capacitatea celulelor endocrine tumorale și non tumorale de a se transdiferenția în celule foliculostelate în care cei doi markeri se suprapun din punct de vedere al expresiei imunohistochimice, aceste celule FS fiind de fapt considerate ca celule stem pluripotente.

VEGF este exprimat în adenoamele pituitare, iar nivele mai mari de expresie se găsesc în macroprolactinoame. VEGF a fost intens studiat privind implicarea sa în procesul angiogenic și, mai puțin ca țintă terapeutică fiind asociat cu fenotipul agresiv și invaziv al adenoamelor hipofizare. Datorită expresiei sale în celulele tumorale și celulele folicular stelate, aplicarea

terapieii anti VEGF ar putea avea o țintă dublă. PDGF acționează asupra celulelor tumorale ale adenoamelor hipofizare și determină inhibarea secreției de prolactină și stimularea secreției de GH. Proteina HER 2 și EGFR au un pattern de expresie specific dependent de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. HER1, cunoscut și sub denumirea de EGFR, reprezintă o țintă terapeutică intens studiată în tumorile maligne, fiind de altfel suportul dezvoltării unor terapii țintite de tipul Cetuximab aplicat deja în cancerule colorectale și pulmonare.

În capitolul VI s-a realizat în premiera o analiză a structurii adenoamelor hipofizare în dependență de aria geografică, fapt ce ar permite punerea în evidență a unor factori de mediu implicați în etiologia acestor tumori. Evaluarea globală a celor două grupuri a demonstrat prezența de diferențe privind profilul hormonal al adenoamelor hipofizare din România și Republica Moldova. Cea mai mare diferență între cele două grupuri s-a înregistrat pentru adenoamele hipofizare plurihormonale.

Fiecare capitol se sfârșește cu concluzii, iar la finele tezei sunt plasate concluziile generale, recomandări practice și planul de cercetare pe viitor.

Bibliografia conține 350 surse bibliografice, majoritatea fiind din ultimii 5 ani.

1. REPERE MORFO-FUNCȚIONALE ALE HIPOFIZEI

1.1. Hipofiza: dezvoltare embriologică și histologie

Hipofiza este formată dintr-un lob anterior (adenohipofiza) și un lob posterior (neurohipofiza), dezvoltarea fiecărei regiuni fiind diferită.

Adenohipofiza sau lobul anterior își are originea într-o îngroșare a stomodeumului ectodermic care în a 3-a săptămână de sarcină, se invaginează în direcție cefalică formând punga Rathke și rămâne conectată cu stomodeumul printr-o tijă subțire. În a 6-a săptămână tija devine atât de îngustă încât pierde atașarea de stomodeum și vine în contact direct cu infundibulul. Un rest al tijeii faringohipofizare demonstrabilă la fetus sau ocazional la adult poate comprima hipofiza. Adenohipofiza localizată central în spatele periostului nazofaringelui se extinde de la posteriorul osului vomer de-a lungul osului sfenoid. Deși spectrul complet al hormonilor hipofizari poate să fie demonstrat în tactul faringopituitar, este rar sediul unor maladii chirurgicale. Rarele malformații ale glandei pituitare care apar în cursul dezvoltării sunt ectopia pituitară și distopia glandulară.

Proliferările celulare în peretele anterior al pungii Rathke dau naștere părții distale, principala porțiune a lobului anterior. O extensie a părții distale denumită parte tuberală crește pentru a înconjura parțial suprafața anterioară a infundibulului. Partea posterioară a pungii lui Rathke dă naștere la un segment subțire al hipofizei denumit parte intermediară sau lob intermediar. În această zonă se pot întâlni microhisturi restante ale pungii Rathke care conțin coloid. Dilatările chistice ale acestor resturi sunt întâlnite frecvent, dar produc rar modificări clinice datorate compresiunii lobului intermediar.

Neurohipofiza se dezvoltă dintr-un mugure neuroectodermal situat în planșeul diencefalului în a 4-a săptămână de sarcină. Două săptămâni mai târziu mugurele crește ventral învecinându-se cu porțiunea posterioară a pungii Rathke. Această porțiune specializată a sistemului nervos conține nucleii neuronali, axonii din eminența tijeii infundibulare și terminațiile lor din partea nervoasă (lobul posterior). Oxitocina, vasopresina și proteinele lor transportoare, neurofizinele, sunt detectate în nucleii supraoptici și paraventriculari în săptămâna 19 și în lobul posterior în săptămâna 23.

Între săptămâna 7-8 de sarcină sistemul portal începe să se dezvolte. Deși în săptămâna a 12-a eminența mediană și lobul anterior sunt vascularizate, circulația sistemului portal hipotalamo-pituitar nu este completă până în săptămâna 20. Prin tehnici de imunohistochimie a fost determinată succesiunea apariției celulelor producătoare de hormoni ai adenohipofizei.

Somatotroful și corticotroful apar prima dată între a 5 și a 12-a săptămână de sarcină, urmat de tireotrof și gonadotrof în săptămâna 12 și respectiv 13. Lactotroful apare între săptămânile 13 și 16.

Hipotalamusul se dezvoltă dintr-o proeminență a diencefalului. Deși nucleii hipotalamici și tactul supraopticohipofizar sunt demonstrați în săptămâna 8 de sarcină, axonii nemielinizați, care cresc ventral de la nucleii supraoptici și paraventriculari nu ajung până la lobul posterior decât în luna a 6-a de sarcină. La 12 săptămâni un număr de plăci cartilagineose fuzionează și formează neurocraniul cartilagin. Corpul osului sfenoid și șaua turcească rezultă din fuziunea plăcilor cartilagineose hipofizare aflate de ambele părți ale glandei. Șaua turcească este bine formată la 7 săptămâni printr-un proces de osificare endocondrală [271].

Dezvoltarea schematică și corespondentul histologic al dezvoltării embrionale sunt sumarizate în Figura 1.1:

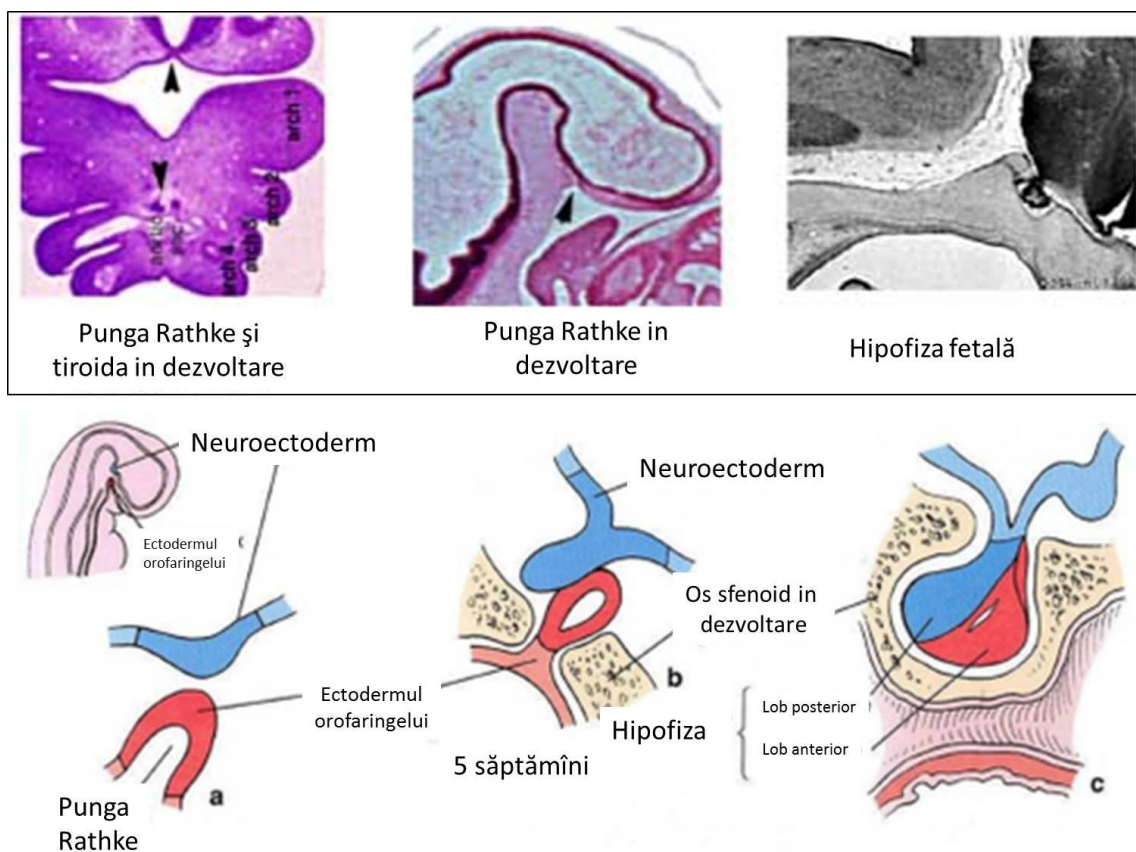


Fig. 1.1 Dezvoltarea embriologică a glandei hipofize. Aspecte histologice (sus) și schematice (jos). Modificat după

https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Embryonic_and_fetal_pituitary.jpg și <https://quizlet.com/17605081/11-overview-of-the-endocrine-system-flash-cards/>

Repere anatomice. Glanda pituitară este situată central la baza creierului, unde este adăpostită în șaua turcească a osului sfenoid. Este atașată de hipotalamus prin intermediul tijeii pituitare și a pachetului vascular. Prin localizare, glanda pituitară are multe interrelații anatomice. Anterior de șaua turcească, osul sfenoid formează o excrescență mediană, tuberculul selar și o indentație transversă, șanțul chiasmatic, numit așa pentru că este acoperit de chiasma optică. Canalul optic prin care trece nervul optic este anterolateral, în timp ce tracturile optice sunt posterolateral. Datorită proximității glandei pituitare cu aparatul optic, leziunile hipofizei care se extind superior pot produce deficite majore ale câmpului vizual. În mod special compresiunea decusației fibrelor la nivelul chiasmei produce hemianopsie bitemporală, în timp ce compromiterea unui singur tract optic duce la hemianopsie omonimă. Extinderea supraselară poate duce la disfuncție hipotalamică și la hidrocefalie [257,271].

Planșeul selar formează o porțiune din acoperișul sinusului osului sfenoid, relație care permite accesul chirurgical. Regiunea selară anterioară se termină prin două proiecții posterolaterale denumite procesele clinoidiene. Posterior de regiunea selară, osul sfenoid se continuă cu dorsum sellae. Un număr de orificii neurovasculare sunt situate în regiunea selară, dinspre anterior spre posterior fiind: foramen rotundum (nervii maxilari), ovale (nervii mandibulari), spinosum (arterele meningiene medii) și lacerum (arterele carotidei interne). Relația fiziologică a meningelui cu glanda pituitară și regiunea selară este neobișnuită în sensul că hipofiza este lipsită de leptomeninge. Periostul durei acoperă șaua turcească în timp ce dura acoperă sinusurile cavernoase și formează diafragma selar. Diafragma este în general subțire în centru și mai gros la periferie prezentând o deschizătură centrală variabilă în dimensiune prin care trece tija hipofizară. Leptomeningele înconjură tija, dar sub nivelul diafragmului selar se reflectă pentru a forma cisterna infradiafragmatică hipofizară. Această dispoziție explică dezvoltarea meningioamelor, dar și incidența redusă a cazurilor intraselare [257,271].

La anumiți indivizi leptomeningele poate avea o variantă anatomică care constă din hernierea arahnoidului printr-un orificiu diafragmatic larg. Incidența arahnoidocelului este destul de ridicată. În asemenea cazuri chirurgia transfenoidală poate produce rinoreea lichidului cerebrospinal prin violarea spațiului subarahnoidian. Creșterea arahnoidocelului poate produce mărire selară și compresie pituitară, glanda devenind redusă la o lamă subțire pe peretele posterior selar. Compresia glandei și deformarea tijeii pituitare poate produce hipopituitarism și hiperprolactinemie [257,2255, 271].

Deși, este considerată glandă endocrină majoră, hipofiza este sub controlul hipotalamusului, cu care formează un circuit complex neurohormonal foarte important pentru

întreg sistemul endocrin. Cântărind 5g și formând pereții și planșeul ventriculului trei, hipotalamusul este localizat deasupra hipofizei de care este legat prin tija pituitară. Deși, aparent este slab demarcat de structurile din jur, hipotalamusul este delimitat anterior de comisura anterioară, chiasma optică, posterior și superior de corpii mamilari, dorsal de șanțul hipotalamic și lateral de nucleii subtalamici. Regiunea este formată din grupe neuronale bine definite funcțional, care poartă denumirea de nucleu. Conexiunile aferente și eferente îi aduc în legătură cu sistemul nervos central, cu celelalte structuri diencefalice, cu cerebelul, creierul și măduva spinării. Sistemul hipotalamo-hipofizar are două sisteme secretorii principale. Unul este format din nucleii supraoptici și paraventriculari și proiecțiile lor în lobul posterior, celălalt din nucleii regiunii tubulare [148].

Nucleii supraoptici sunt localizați superior de tracturile optice, în timp ce nucleii *paraventriculari* sunt situați ventromedial de fornix lângă peretele ventriculului trei. Datorită faptului că neuronii sunt mari, acești nucleu au fost denumiți magnocelulari. Conțin neuroni care produc vasopresină și oxitocină, dar un neuron produce doar un singur tip de hormon. Axonii lor formează tracturile supraoptico-hipofizare și paraventriculo-hipofizare care transportă vasopresina și oxitocina, și proteinele lor transportoare denumite neurofizine la lobul posterior hipofizar. Oxitocina și vasopresina sunt nonapeptide sintetizate ca prohormoni care includ în structura lor proteine transportoare, neurofizine, bogate în cisteină. Moleculele precursoră sunt asamblate în granulele secretorii ale aparatului Golgi și transportate prin fluxul axoplasmic al neuronilor amielinici la nivelul lobului posterior. Aici sunt eliberați printr-un proces de exocitoză calciu dependent. Acumulările mari intraaxonale ale acestor hormoni, corpii Herring, la microscopul optic sunt rotunde, granulare și eozinofile la colorația cu hematoxilină-eozină. Deși diferă biochimic prin componența a doar doi aminoacizi, oxitocina are doar activitate antidiuretică virtuală, în timp ce vasopresina are efect oxitocic neglijabil. Oxitocina mediază ejecția laptelui producând contracția celulelor mioepiteliale care înconjoară lobulii mamari. Are rol în contracția uterului la naștere, dar nu induce travaliul [148,257,271].

Rolul major al vasopresinei este formarea urinei hipertone. Vasopresina crește permeabilitatea pentru apă a ductelor colectoare renale, permițând fluidului hipotonic intraductal să echilibreze fluidul hipertonic din interstițiul medular renal. Rezultatul este concentrarea urinei și conservarea apei în organism.

Hormoni adiționali și neuropeptide au mai fost identificați în neurohipofiză: somatostatina, hormonul de eliberare al tirotrofinei, hormonul de eliberare al gonadotrofinei, substanța P, histamină, serotonină, dopamină, corticoliberină, beta-lipotrofin, dar funcțiile lor la acest nivel sunt incerte.

A doua componentă a sistemului hipotalamo-hipofizar este tractul tubero-infundibular. Fibrele acestui tract au originea în nucleii hipotalamici situați între pereții ventriculului trei și regiunea tuberală, nucleii produc hormoni inhibitori ai hipofizei anterioare. Spre deosebire de neuronii mari ai nucleilor supraoptici și paraventriculari acești neuroni sunt mici, procesele lor se proiectează la nivelul eminentei mediane, o zonă intens vascularizată, localizată în porțiunea proximală posterioară a tijei pituitare. Aici sunt eliberați factorii hipofizotrofi în prima porțiune a sistemului port pentru a fi transportați la lobul anterior. Ultrastructural eminența mediană este formată din terminații nervoase care conțin granule de neurosecreție, delimitate de membrane. Pentru că aceste terminații sunt situate foarte aproape de capilarele fenestrate care sunt la originea sistemului port hipofizar, hormonii și factorii de eliberare sunt eliminați rapid în circulație și de aici în lobul anterior [257, 255, 271].

Vascularizația. Secreția glandelor endocrine este dependentă de stimulul nervos, iar activitatea secretorie a adenohipofizei depinde de activarea celulelor sale prin factorii de eliberare. Aceștia sunt sintetizați de către neuronii hipotalamici și ajung la lobul anterior prin sistemul port hipofizar. Arhitectura vasculară atipică a glandei are rol esențial pentru funcția sa. Structurile vasculare au importanță majoră în chirurgia regiunii selare. Sinusurile cavernoase sunt situate de o parte și de alta a regiunii selare comunicând lateral și superior cu sinusurile sfenoide. Drenajul venos al sinusurilor este realizat de numeroase surse, incluzând ochiul (vena oftalmică superioară), creierul (vena cerebrală inferioară și mijlocie) și sinusul sfenoparietal. Comunicarea dintre sinusurile cavernoase stâng și drept se realizează prin sinusurile intercavernoase care delimitează anterior și posterior regiunea selară. Acest complex formează un inel venos în jurul regiunii selare și conținutului său. Sinusurile intercavernoase sunt localizate pe suprafața ventrală a hipofizei. Sinusurile cavernoase sunt mai mult decât o simplă confluență de canale venoase. Mai degrabă reprezintă cavități extradurale conținând structuri neuro-vasculare vitale. Acestea includ segmentele cavernoase ale carotidei interne la fel ca și segmente ale nervilor cranieni III, IV, V și VI. Un țesut areolar delicat umple interstițiul dintre canalele nervoase, artere și nervi. Mai multe ramuri ale carotidei interne pleacă din sinusurile cavernoase incluzând trunchiul meningohipofizar, artera sinusului cavernos inferior și câteva mici ramuri capsulare. Din trunchiul meningohipofizar rezultă artera hipofizară inferioară care irigă lobul posterior și capsula hipofizară [257,148,271].

Vascularizația principală a hipofizei se realizează prin artera hipofizară superioară și inferioară ramuri din carotida internă. O singură arteră hipofizară superioară rezultă din fiecare carotidă și imediat după ce intră în cavitatea craniană se divide în ramuri posterioară și anterioară

care se anastomozează cu ramurile corespondente de pe partea opusă formând un inel în jurul tijei hipofizare. Ramurile anterioare dau naștere arterelor trabeculare care coboară pe fața superioară a lobului anterior, pe tija hipofizară și se termină de-a lungul părții tuberale. Ramurile posterioare și anterioare a arterelor hipofizare superioare dau și câteva artere scurte care penetrează tija hipofizară. În contrast cu arterele hipofizare superioare, ramurile inferioare au originea în trunchiul meningohipofizar și ajung în contact inferolateral cu glanda, se bifurcă în ramuri mediale și laterale care se anastomozează cu cele de parte opusă pentru a forma un cerc arterial în jurul lobului posterior. Aceste ramuri ale arterelor hipofizare inferioare irigă lobul posterior și porțiunea inferioară a tijei hipofizare. Deși multe din arterele tijei pituitare formează arteriole și capilare, câteva formează un complex vascular caracterizat de o arteră centrală înconjurată de capilare glomerulare. Tranziția de la artera centrală la capilare se realizează printr-o arteriolă scurtă specializată prezentată de un sfincter muscular neted care reglează fluxul sanguin [257,271].

Sistemul hipofizar portal realizează legătura dintre hipotalamus și hipofiză, are originea în plexurile capilare ale tijei hipofizare și eminentei mediane care rezultă din ramificațiile terminale ale arterelor hipofizare superioare și inferioare. Plexurile capilare din eminența mediană și partea superioară a tijei, situsul factorilor hipofiziotrofi, drenează în vasele porte care parcurg suprafața tijei pentru a vasculariza majoritatea lobului anterior, în timp ce capilare mici din partea inferioară a tijei dau naștere vaselor porte care coboară în regiunea centrală a tijei spre lobul posterior. Distal sistemul port comunică cu o rețea de capilare în lobul anterior care transportă factorii hipofiziotrofi la glanda hipofiză și hormonii lobului anterior în circulație.

Drenajul venos se realizează în sinusurile subhipofizare, cavernoase și circular superior. Majoritatea vaselor lobului anterior au originea în vasele porte și este de tip venos. Vascularizația lobului posterior este directă și arterială [257].

Histologia hipofizei. Aspectele histologice ale hipofizei normale sunt de cele mai multe ori studiate pe secțiuni histologice provenite de la alte specii și, într-o foarte mică măsură sunt descrise în literatură aspectele morfologice, celulare și moleculare ale hipofizei normale. Aceasta derivă din faptul că, țesutul hipofizar normal poate fi colectat autptic în principal și, într-o mai mică măsură în urma intervențiilor chirurgicale pentru terapia adenoamelor hipofizare. Mai mult, un alt neajuns al țesuturilor colectate post mortem este acela că, țesutul hipofizar suferă o degenerare rapidă cu autoliză marcată, aspect care împiedică studiul morfologic dar, mai ales imunohistochimic și molecular al celulelor hipofizei umane normale [148].

Adenohipofiza. Lobul anterior reprezintă 80% din glanda hipofiză și include *porțiunea*

distală, intermediară și tuberală. În microscopia optică celulele lobului anterior sunt diferite nu numai ca mărime și formă, dar și în ceea ce privește caracteristicile histochimice. Celulele sunt aranjate în cuiburi, cordoane și mici acini, legate printr-o rețea de capilare. Stroma este bogată în fibre de reticulină care susțin peretele subțire al vaselor capilare fenestrate. Structura fenestrată a peretelui capilar facilitează difuzia factorilor de eliberare din sânge și pasajul produșilor de secreție spre sângele circulant. Acest pattern arhitectural este alterat în hiperplazie și absent în adenoame, este util în diagnostic. Porțiunea intermediară este formată din cavități pline cu coloid PAS pozitiv, delimitat de celule epiteliale. Epiteliul care delimitează coloidul este format din celule ciliate, caliciforme și endocrine, ultimele sunt imunopozitive pentru hormonii hipofizari [148,257,271].

Porțiunea distală. În funcție de afinitatea pentru coloranții uzuali, celulele porțiunii distale sunt clasificate în *cromofile* și *cromofobe*. Celulele cromofile sunt la rândul lor acidofile și bazofile. Bazofilia se referă în cazul adenohipofizei la proprietățile tinctoriale ale granulelor de secreție și nu trebuie confundată cu bazofilia indusă de ribonucleoproteine. Cu colorația H-E se pot identifica trei tipuri principale de celule în porțiunea distală: acidofile 40%, bazofile 10% și cromofobe 50%. Această clasificare celulară în funcție de afinitatea pentru un anumit colorant oferă puține elemente specifice pentru conținutul hormonal sau funcția endocrină. Ultrastructural și imunohistochimic s-a demonstrat că există mai multe tipuri de celule, diferite ca mărime, formă și imunoreactivitate a granulelor secretorii. Clasificarea actuală a celulelor adenohipofizei are la bază tipul de hormon sintetizat: celule care secretă TSH - tireotrofe, celule care secretă hormoni gonadotrofi - gonadotrofe, celule care secretă ACTH - corticotrofe. Se mai utilizează denumirile de celule TSH, celule FSH, celule ACTH, celule STH [257,255,271].

Celulele acidofile conțin în citoplasmă granulații colorate în roșu-orange cu eozină, sunt PAS negative și sunt reprezentate de celulele somatotrofe și mamotrofe. Celulele bazofile conțin în citoplasmă granulații bazofile (se pun în evidență cu coloranți bazici) colorate în albastru cu hematoxilina, sunt PAS pozitive și sunt reprezentate de celulele corticotrofe, tireotrofe și gonadotrofe.

Celulele somatotrofe sunt cele mai numeroase la nivelul porțiunii distale (50%) și sintetizează hormonul de creștere – *somatotrofina (STH)*. Pot fi identificate specific cu anticorpi anti-STH, fiind dispuse predominant pe părțile laterale ale porțiunii distale. Celulele aflate în faza de repaus sunt de mărime medie, rotunde sau ovoidale, cu nucleu rotund localizat central, cu nucleol proeminent. În faza secretorie nucleul devine neregulat, fără nucleol. Ultrastructural, în faza de repaus, conțin numeroase granule sferice cu diametrul de 300-350 nm, având RE și

complexul Golgi slab dezvoltate. În faza secretorie, ca urmare a eliberării granulelor, numărul acestora scade, în timp ce RE și complexul Golgi devin bine dezvoltate. Secreția este stimulată de hormonul de eliberare al STH produs de către neuronii hipotalamici și este inhibată de către somatostatina. STH are efect sistemic, crescând rata metabolismului celular, stimulând înglobarea aminoacizilor, sintezele proteice, mobilizarea acizilor grași și scăderea ratei de utilizare a glucozei. Hormonul stimulează hepatocitele pentru a produce somatomedine (insulin-like growth factor I și II), care, la rândul lor, stimulează rata mitozelor la nivelul condrocitelor din zona cartilajului de creștere, promovând astfel creșterea oaselor în lungime [148,257, 271].

Celulele mamotrofe sau lactotrofe sunt dispuse adesea individual, fiind concentrate în porțiunea posterioară a zonei laterale, reprezentând 15-20% din celularitatea porțiunii distale. Secretă *prolactina (PRL)* sau lactotrofina, care stimulează dezvoltarea glandelor mamare în sarcină și lactație. Histologic sunt fie acidofile, cu numeroase granulații citoplasmice, fie cromofobe cu granulații puține, fiind în relație directă cu statusul funcțional. Astfel, în faza de repaus, celulele au dimensiuni mari, sunt de formă poliedrică elongată și prezintă nucleu ovoidal. Ultrastructural posedă relativ puține organite nespecifice (complex Golgi și RE), însă conțin numeroase granulații cu dimensiuni de 500-800 nm. În faza secretorie celulele au formă poliedrică elongată cu nucleu ovoidal, însă au dimensiuni mai mici, conțin multe organite nespecifice și puține granulații specifice. Prolactina acționează prin intermediul receptorilor specifici asupra diferitelor organe: glanda mamară, ficat, ovar, testicul și prostată [148,257, 271].

Dublarea volumului glandei hipofizare în sarcină se datorează hiperplaziei și hipertrofiei celulelor mamotrofe cromofobe, denumite *celule de sarcină*. Ele persistă scurt timp după travaliu sau până la terminarea lactației. Hiperplazia celulelor secretoare de prolactină se poate asocia și cu administrarea de estrogeni sau cu hipotiroidismul. În timpul sarcinii nivelele ridicate de estrogen, progesteron și prolactină produc dezvoltare acinară și induc formarea laptelui. Secreția lactată este sub controlul oxitocinei, un stimulator puternic al contracției celulelor mioepiteliate de la nivelul glandei mamare. Impulsurile nervoase generate de stimularea mecanică a mamelonului sunt transmise la hipotalamus, aici se sintetizează oxitocina care la rândul ei stimulează sinteza prolactinei. Astfel, secreția prolactinei este stimulată de actul suptului și se observă la câteva minute de la inițiere. Funcția prolactinei este de a stimula formarea cazeinei, lactalbuminei, lipidelor, carbohidraților, componenți esențiali ai laptelui matern.

La terminarea lactației celulele mamotrofe regresează numeric și dimensional. Granulele secretorii în exces fuzionează cu lizozomii, formează vacuole de autofagie care sunt degradate de către enzimele hidrolitice; procesul se numește crinofagie. Excesul de organite se elimină prin

autofagie, iar o parte dintre celulele degenerază în totalitate. În lactație, celulele mamotrofe reprezintă 50% din populația celulară a porțiunii distale, iar la 7 zile după terminarea acesteia, doar 25%. Cu excepția sarcinii și lactației nu există nici o diferență semnificativă dintre celulele secretorii de prolactină la cele două sexe [148,257, 271].

Este cunoscut, dar inexplicabil faptul că celulele mamotrofe au tendința de a coafa celulele gonadotrofe, probabil ca expresie a relațiilor fiziologice. Secreția de prolactină este sub controlul inhibitor al dopaminei, principalul factor de inhibiție hipotalamic al prolactinei (PIF). Orice proces care comprimă tija pituitară împiedică eliberarea de PIF în lobul anterior producând hiperprolactinemie, fenomen denumit „efect de tijă”. Gonadotrofina inhibă eliberarea de lactotrofină în timp ce VIP-ul și TRH-ul stimulează eliberarea de lactotrofină [114,257,271].

Celulele corticotrofe reprezintă 15-20% din celulele porțiunii distale, fiind mai numeroase în zona mediană (mijlocie și posterioară), secretă *corticotrofina (ACTH)*, sinteza fiind stimulată de hormonul de eliberare hipotalamic. Specifică pentru identificarea lor este doar metoda imunohistochimică cu anticorpi anti-ACTH. Histologic, sunt celule ovalare sau poligonale, cu nucleu rotund localizat excentric. Ultrastructural conțin numeroase organite nespecifice (RE, complex Golgi și lizozomi mari), iar granulațiile relativ numeroase sunt localizate predominant la periferia celulei, având dimensiuni care variază între 250-700 nm [148,257, 271].

Sunt intens PAS pozitive datorată carbohidraților din *proopiomelanocortin (POMC)*, precursorul ACTH-ului. Celulele corticotrofe conțin ACTH, hormonul de stimulare a melanocitelor (MSH), endorfină, encefalină și alți derivați ai POMC, toate putând fi evidențiate imunohistochimic. O caracteristică a acestor celule este absența colorării regiunii perinucleare. Această structură sferică cu centrul clar înconjurat de un inel întunecat corespunde ultrastructural unor vacuole delimitate de membrane care sunt structuri lizozomale specifice, a căror semnificație este neclară. Filamente perinucleare de citokeratină sunt caracteristice celulelor secretoare de ACTH. În condițiile excesului de glucocorticoizi exogeni sau endogeni, celulele acumulează microfilamente de tip I ca manifestare a modificării hialine a celulelor producătoare de ACTH.

ACTH-ul este principalul produs al celulelor corticotrofe și principalul derivat al POMC. ACTH-ul stimulează secreția de glucocorticoizi, mineralocorticoizi și androgeni din cortexul adrenal. Crește secreția proteică în glandele adrenale, care are ca efect hiperplazia corticală. În afara acestor funcții, ACTH-ul are rol esențial în transportul aminoacizilor și al glucozei în mușchi și stimulează eliberarea insulinei din pancreas [148,257, 271].

Celulele tirotrofe reprezintă 5% din celularitatea parenchimului porțiunii distale, sunt dispuse în cordoane la distanță de capilarele sinusoide, mai numeroase în zona mediană anterioară și produc *tirotrofina (TSH)*. Sunt celule de dimensiuni medii de formă poligonală, cu nucleu rotund situat excentric. Se colorează cu reactivi bazici și sunt PAS pozitive. Ultrastructural conțin numeroase organite nespecifice, puțini lizozomi, precum și relativ numeroase granule mici, cu dimensiuni de 150 nm, localizate în citoplasma periferică. TSH stimulează sinteza tiroglobulinei și secreția tiroxinei și triiodtironinei, acționând asupra celulelor foliculare tiroidiene. Activarea celulelor tirotrofe depinde de hormonul de eliberare al TSH-ului sintetizat de hipotalamus. Sinteza sa este limitată prin mecanism feed-back. În hipotiroidismul primar celulele tirotrofe sunt hipertrofiate și hiperplaziate. În exces, se produce hipertrofie pituitară care mimează adenomul [148,257, 271].

Celulele gonadotrofe reprezintă 10% din celularitatea parenchimului porțiunii distale, având distribuție difuză. Sunt situate în vecinătatea vaselor capilare și sintetizează hormonii gonadotrofi *foliculo-stimulant (FSH)* și *luteinizant (LH)*. Celulele gonadotrofe sunt de mărime medie, au formă ovalară și nucleu rotund situat excentric. Ultrastructural conțin numeroase organite nespecifice (complex Golgi și RE), precum și granulații cu dimensiuni între 250 și 400 nm. Studiile imunohistochimice și ultrastructurale au arătat că cei doi hormoni pot fi produși fie de celule diferite, fie de aceeași celulă. Celulele gonadotrofe au afinitate puternică pentru coloranți bazici și pentru reacția PAS. LH-ul și FSH-ul au rol distinct și esențial în fiziologia aparatului genital. La femeie LH-ul produce ovulația și corpul luteal. La bărbat stimulează producerea de testosteron de către celulele interstițiale Leydig. FSH-ul produce maturarea foliculară la femeie, în timp ce la bărbat stimulează celulele Sertoli pentru a produce proteina de legare a androgenilor [148,257, 271].

Celulele folicular stelate reprezintă 5% din celulele lobului anterior, cu dispoziție difuză. Sunt principalele celule non-secretorii ale porțiunii distale a adenohipofizei. Participă la formarea unor structuri foliculare în porțiunea distală și a chistelor din porțiunea intermediară a adenohipofizei. Formează complexe joncționale, prezintă microvili la polul apical și ocazional cili proiectați spre lumen. Din cauza tendinței lor de a forma agregate epiteloide în jurul unor lumene mici au primit denumirea de celule foliculare. Au prelungiri citoplasmice care se extind printre celulele cromofile, realizând joncțiuni gap cu prelungirile celulelor folicular stelate vecine. Astfel formează o rețea tridimensională în întreaga adenohipofiză, de unde derivă termenul de celule stelate. Nu au granule citoplasmice, ci doar incluziuni lipidice și de glicogen, și au fost confundate mult timp cu celulele cromofobe. Sunt capabile de diviziune

mitotică, dar nu s-a demonstrat că se pot transforma în celule acidofile și bazofile. Sunt prezente uneori în adenoame. Au rol de celule gliale, de suport și izolare electrolitică și fluidă a celulelor secretorii. Sunt interconectate prin joncțiuni de tip gap, care reprezintă calea de comunicare pentru întreaga rețea [148, 257].

Imunohistochimic se identifică cu proteina S100, o substanță care nu este prezentă în alte celule ale lobului anterior. GFAP (anticorpi anti-proteină fibrilară acidă glială) și vimentina pot fi prezente în celulele folicular stelate, dar sunt nespecifice. Rolul fiziologic al celulelor folicular stelate este neclar, deși ar putea fi implicate în reglarea secreției hormonale. Configurația lor și prezența a numeroase granule de secreție sugerează faptul că ar putea fi derivate din celulele secretorii. Relația celule foliculare și celule folicular stelate este încă incomplet studiată.

Porțiunea intermediară este localizată între porțiunea distală a adenohipofizei și neurohipofiză. Lipsește din hipofiza umană la adult, este formată dintr-un epiteliu simplu cubic la făt și în prima perioadă a copilăriei. La fătul uman reprezintă 3% din volumul adenohipofizei, iar la adult nu se mai identifică sub forma unui strat distinct. La acest nivel se observă uneori chisturi mici, adesea limitați de epiteliu ciliat, care conțin un fluid vâscos, galben-pal. Odată cu dispariția șanțului hipofizar, celulele sunt dispersate în grupe mici sau izolate. Pot fi prezente în țesutul nervos al procesului infundibular, unde se identifică doar imunohistochimic. Uneori la adult celulele bazofile ale parenchimului se dispun în cordoane longitudinale care ocupă spațiile dintre vase. Celulele epiteliale ale porțiunii intermediare au formă poligonală, complexul Golgi și RE rugos bine dezvoltate și conțin numeroase mitocondrii, având citoplasma bazofilă. Secretă hormonul *α-melano-stimulator (α-MSH)* care induce sinteza și dispersia melaninei, fiind identificat în același timp și prohormonul – *proopiomelanocortinul(POMC)* [148,257, 271].

Porțiunea tuberală este o extensie a lobului anterior care înconjoară tija pituitară, adesea lipsind posterior. Porțiunea este subțire, separată de infundibul prin țesut conjunctiv continuu cu piamater și arahnoida. Celulele parenchimului sunt cuboidale sau columnare joase, dispuse în cordoane longitudinale și structuri acinare dispuse printre vasele portale. Este cea mai bine vascularizată porțiune a hipofizei. Aceste celule prezintă imunoreactivitate pentru ACTH, FSH și LH. Deși, în termeni funcționali aceste celule nu diferă de celulele similare din porțiunea distală, prezintă frecvent metaplazie scuamoasă. Citoplasma bazofilă, conține multe granulații mici, lipide glicogen și ocazional coloid [148,257,255].

Variații morfologice. Un număr de variații normale histologice a glandei hipofize pot mima leziuni histopatologice. Celulele scuamoase care formează cuiburi cu predilecție în porțiunea tuberală sunt întâlnite în 24% din cazuri; rezultă printr-un proces de metaplazie a

celulelor adenohipofizare, evidențiat prin expresia simultană a citokeratinei și a hormonilor hipofizari. Invazia bazofilă a lobului posterior întâlnită la bărbații în vârstă poate mima adenomul. Celulele bazofile corticotrofe se extind din partea intermediară la neurohipofiză. Deși aceste celule sunt imunoreactive la ACTH, endorfine și alți derivați de POMC, conțin și câteva filamente de citokeratină și sunt mai puțin susceptibile la hialinizare ca răspuns la hipercortizolism. Resturile de glande salivare se pot găsi în neurohipofiză, posterior de partea intermediară. Sunt formate dintr-un singur strat de celule cubice sau columnare cu nuclei situați la polul inferior și cu citoplasmă PAS pozitivă. Ultrastructural conțin reticul endoplasmic bine dezvoltat, microvili și picături secretorii. Celulele granulare sunt localizate în tijă sau în lobul posterior și reprezintă 6% din cazuri în special la bărbații în vârstă. Sunt celule cu citoplasmă granulară acidofilă și intens PAS pozitivă și cu nuclei mici [148, 271].

Modificări induse de vârstă. Celulele pituitare variază în funcție de vârstă. În sarcină celulele lactotrofe sunt hiperplazice datorită nivelurilor ridicate de hormoni estrogeni. Glanda la prepubertate conține celule gonadotrofe slab dezvoltate. La adult glanda prezintă câteva modificări odată cu înaintarea în vârstă. Celulele somatotrofe și lactotrofe nu prezintă modificări semnificative de număr sau de distribuție odată cu înaintarea în vârstă. Fibroza este cea mai frecventă modificare indusă de vârstă, are distribuție perivasculară. Incidența prezenței amiloidului este corelată cu vârsta, cu prevalența bolilor pulmonare obstructive și a diabetului zaharat non-insulino-dependent [255].

Neurohipofiza. Lobul posterior este o extensie ventrală a sistemului nervos central fiind situsul de eliberare al hormonilor hipotalamici oxitocina și vasopresina. Este constituită din eminența mediană, infundibulul (continuarea hipotalamusului) și partea nervoasă.

Axonii neuronilor secretori, ai căror corpi neuronali sunt localizați în nucleii supraoptic și paraventricular din hipotalamus, pătrund în hipofiza posterioară și se termină în vecinătatea vaselor capilare, formând tractul hipotalamo-hipofizar. Acești neuroni sintetizează doi hormoni: *vasopresina* sau hormonul antidiuretic (ADH) și *oxitocina*. Sunt de natură peptidică, sintetizați dintr-un precursor cu moleculă mare și din neurofizină. Neurofizinele asociate cu oxitocina și vasopresina sunt biochimic distincte. În timpul transportului axonal prin tractul hipotalamo-hipofizar prohormonul este clivat și la nivelul terminației axonale sunt eliberați hormonii și neurofizinele. Oxitocina are ca țintă celulele mioepiteliale și celulele musculare netede ale miometrului.

Ținta majoră pentru vasopresină este reprezentată de celula ductală din tubii colectori renali. Vasopresina circulantă se leagă de receptori specifici, situați la nivelul microdomeniilor

bazale și laterale și prin activarea sistemului AMPc - proteinkinază, crește permeabilitatea membranei celulare pentru apă. Din acest motiv, mai poartă numele de hormon antidiuretic. În absența vasopresinei, celulele tubului distal și tubilor colectori sunt impermeabile pentru apă (tumori cerebrale care au invadat hipotalamusul). Afecțiunea se numește diabet insipid și este caracterizată de polidipsie și poliurie (cantitatea de urină eliminată pe zi putând ajunge la 18-20 l/zi). În aceste condiții, neurohipofiza este neobișnuit de mare, dar conține puține granule de neurosecreție, iar vasopresina nu poate fi identificată imunohistochimic [155, 255, 257, 271].

Vasopresina este implicată și în reglarea presiunii sanguine. Scăderea volumului sanguin stimulează secreția acesteia, astfel încât după hemoragii masive secreția de ADH este de 50 de ori mai mare decât la normal. Acționează asupra musculaturii vasculare determinând vasoconstricție arteriolară, crește rezistența vasculară periferică și limitează eliminarea apei pe cale urinară.

Elementele structurale ale neurohipofizei sunt *axoni amielinici* ai neuronilor cu originea în nucleii supraoptici și paraventriculari, o *rețea de capilare* și *celule gliale* specializate denumite pituicite. Fibrele neurosecretorii sunt asociate cu pituicite, axonii fibrelor fiind frecvent coafați de pituicite. Histologic, axonii lobului posterior pot fi ușor identificați folosind impregnările argentice. Dilatațiile axonale focale cunoscute sub denumirea de *corpi Herring*, reprezintă acumulări intraaxonale a hormonilor lobului posterior, fiind vizibile pe secțiunile colorate cu hematoxilina aluminată. Apar sub forma unor agregate de material intens colorat de diferite dimensiuni, bazofile și sunt pozitive pentru glucide (reacția PAS, metacromazie la albastru de toluidină). În ME se prezintă ca agregate de mici granule neurosecretorii, localizate în dilatații axonale. Se estimează că fiecare axon are câte 450 astfel de expansiuni de-a lungul traiectului și conține în medie 2.000 de granule. În jur de 60% dintre granulații sunt localizate în aceste dilatații, iar 40% în terminațiile axonale, asociate capilarelor fenestrate din lobul posterior. Ultrastructural, axonii amielinici apar ca fibre delicate, având 0,05 μm diametru, conțin microtubuli și neurofilamente. Există două tipuri de axoni neurosecretori, tipul A și tipul B, în funcție de morfologia granulelor. Fibrele de tip A, mai numeroase decât de tip B, conțin granule de oxitocină și vasopresină cu dimensiuni de 100-300 nm, în timp ce fibrele de tip B conțin granule cu dimensiuni între 50 și 100 nm. Practic, funcția cea mai importantă a neurohipofizei este de transfer al hormonilor din granulele secretorii în spațiul intravascular [148,257, 271].

Pituicitele sunt celule asemănătoare neurogliilor stelate, care ocupă aproximativ 25% din volumul porțiunii nervoase a neuro-hipofizei și care prin prelungiri citoplasmatică formează o rețea tridimensională între axonii neuronilor hipotalamici. Prelungirile sunt conectate

între ele prin joncțiuni de tip gap, care au rol de sincronizare metabolică. Aceste celule sunt imunopozitive la GFAP (filament intermediar caracteristic astrocitelor), la proteina S100 și vimentină (Figura 1.2). La om, pituicitele au mărimi și forme variabile, pot conține incluziuni lipidice și pigment lipocrom. Prelungirile acestor celule înconjoară adesea terminațiile axonale. Nu au rol în procesele secretorii, dar reprezintă suportul mecanic și trofic pentru celulele nervoase și mențin constantă compoziția ionică a fluidului extracelular. Pituicitele sunt de cinci tipuri: majore, întunecate, endimare, oncocitice și granulare. Morfologia lor foarte diversă de la tipul major astrocitic până la cel endimare, pare a fi o reflecție a rolului lor fiziologic [148, 257, 271].

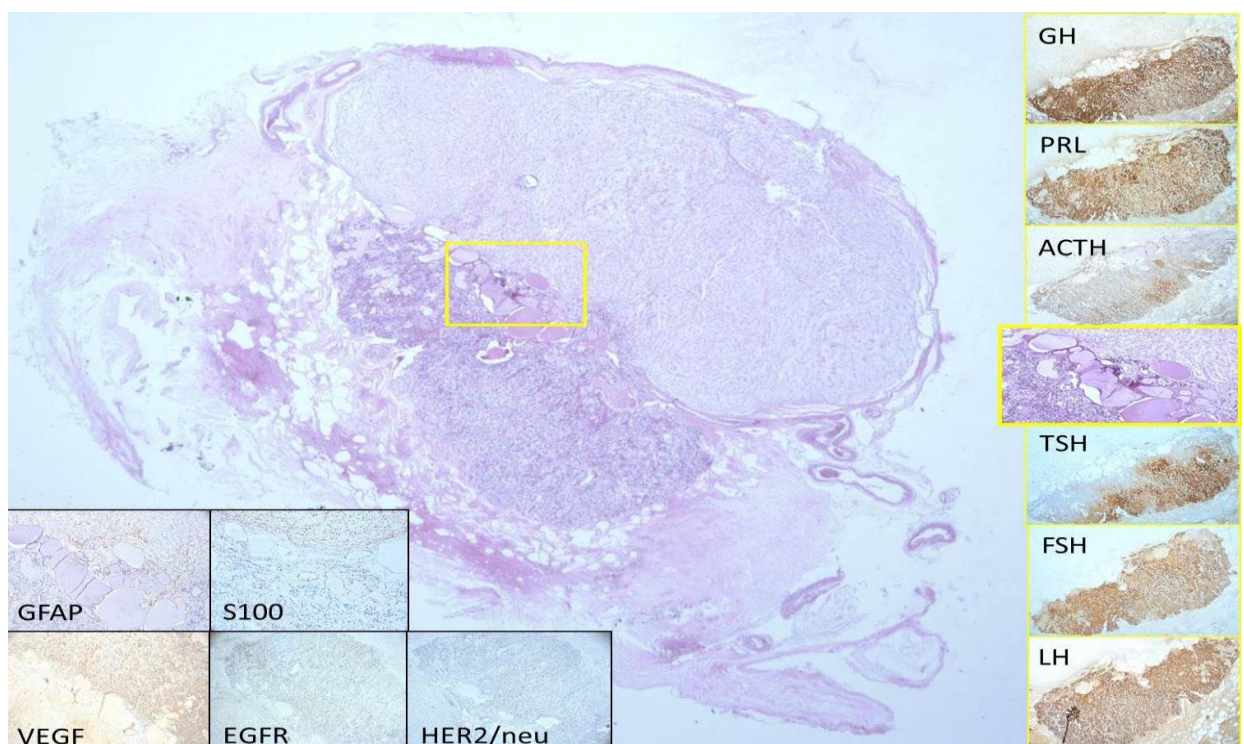


Fig. 1.2. Hipofiza normală umană, imagine de ansamblu. Profilul hormonal imunohistochimic pentru cei șase hormoni specifici adenohipofizei. Expresia factorilor de creștere în hipofiza normală alături de expresia GFAP și S100 în adeno- și neuro-hipofiză.

Hormoni hipofizari în alte organe. În trecut se considera că hormonii hipofizari sunt produși doar la nivelul glandei de către celulele specifice. Imunohistochimic, toți hormonii hipofizari, cu excepția celor gonadotrofi, au fost identificați în sistemul nervos central. Acești hormoni „ectopici” au fost inițial considerați ca fiind tot de origine hipofizară, dar datele actuale pledează pentru sinteza lor în neuronii SNC. Astfel, concentrația de ACTH, alfa MSH, beta

endorfină și STH rămâne nemodificată după hipofizectomie. Se pare că au rol în procesele învățării și comportamentului, se comportă ca și neurotransmițători și modulează acțiunea altor neuromediatori asupra neuronilor țintă. Imunoreactivitatea pentru ACTH a fost demonstrată în unele celule ale tractului digestiv și în unele tumori pulmonare dezvoltate din corpii neuroepiteliali. Alții, ca vasopresina, oxitocina, alfa MSH au fost identificați în ovar, având efecte paracrine [148].

1.2. Adenoamele hipofizare: histopatologie și profil molecular: controverse și certitudini

Clasificarea adenoamelor hipofizare. De la prima clasificare morfologică propusă de Cushing în 1912 și până în prezent, clasificările adenoamelor hipofizare au urmărit să combine aspectele morfologice ale tumorilor cu aspectele clinico-endocrinologice prezentate de pacient. Cu ajutorul tehnicilor moderne de diagnostic a tumorilor, a corelației dintre activitatea endocrină și aspectele morfologice, profilului imunohistochimic, aspectelor ultrstructurale, au fost obținute o serie de progrese în înțelegerea biologiei și patogeniei tumorilor adenohipofizare. Clasificarea clinico/morfologică folosită în prezent de multe laboratoare, nu numai că ne ajută să înțelegem citogeneza adenoamelor, dar și să identificăm diferitele tipuri tumorale care pot prezenta clinic o simptomatologie similară. În ultimii ani, noi tehnici moleculare au fost folosite în studiul adenoamelor hipofizare. Aplicarea hibridizării in-situ și a altor metode moleculare în studii experimentale ale adenoamelor hipofizare au introdus diferite perspective în înțelegerea funcțiilor endocrine și celulare ale acestor tumori [128, 171].

Adenoamele hipofizare se împart din punct de vedere clinic în două grupe: adenoame clinic funcționale și adenoame clinic non-funcționale, în funcție de prezența sau nu a sindromului endocrin [163, 280]. Majoritatea adenoamelor sunt funcționale și produc PRL, STH, ACTH. Aproximativ o treime din adenoame nu se asociază cu secreție hormonală și tablou clinic endocrin. Aceste adenoame non-funcționale sunt însoțite de un tablou clinic determinat de efectul de masă al tumorii și cuprinde simptome ca: cefalee, deficite neurologice a nervilor cranieni, incluzând tulburări ale câmpului vizual și o hiperprolactinemie moderată datorită compresiunii tije hipofizare (efect de tija) [125].

Conform dimensiunilor tumorii, adenoamele se divid în microadenoame (diametru < 1 cm) și macroadenoame (diametru > 1 cm). Adenoame gigante (> 4 cm) sunt rar întâlnite. Macroadenoamele prezintă o tendință crescută de a se extinde supraselar, de a invada țesuturile vecine și de a recidiva [161]. O clasificare radiologică, propusă de Hardy, este foarte folosită în practica clinică [114].

Clasificarea în funcție de proprietățile tinctoriale ale celulelor tumorale în adenoame acidofile, bazofile și cromofobe, este depășită deoarece nu identifică specific tipurile de adenoame. Acestea prezintă diferite modele de creștere (difuz, papilar, trabecular, etc.). Chiar dacă aceste aspecte histologice nu influențează prognosticul, recunoașterea lor este importantă în studierea leziunilor care pot fi luate în considerare în diagnosticul diferențial al adenoamelor. Imunohistochimia este o metodă importantă de clasificare, dar nici ea nu poate distinge un număr

de subtipuri tumorale specifice. Pentru o clasificare comprehensivă, este necesară analiza ultrastructurală a adenoamelor. Diferitele tipuri de adenoame sunt prezentate pe baza profilului lor imunohistochimic, alături de care există remarci importante în legătură cu aspectele ultrastructurale ale tumorilor [179].

Potențialul invaziv și proliferativ al adenoamelor. Adenoamele hipofizare pot crește fie expansionându-se, fie invadând structurile adiacente. În primul caz, tumorile sunt mici, bine delimitate și restricționate în șaua turcească. Adenoamele invazive au de obicei o creștere rapidă, invadând țesuturile vecine ca sinusul sfenoid, sinusul cavernos și în unele cazuri chiar țesutul cerebral.

Mecanismul invaziv al acestor adenoame agresive nu este încă înțeles pe deplin. Proliferarea continuă de la adenom la adenom invaziv și carcinom nu a fost demonstrată în marea majoritate a tumorilor. Tendința de infiltrare locală a adenoamelor hipofizare și invazie a țesuturilor adiacente pare a nu se corela cu aspectele histologice ale tumorii. Adenoamele invazive nu trebuie să prezinte neapărat aspecte histologice de agresivitate incluzând pleomorfismul, atipia nucleară și activitate mitotică. Chiar dacă atât adenoamele funcționale, cât și cele nefuncționale se pot prezenta ca tumori invazive, s-a observat că cele funcționale au această proprietate mult mai frecvent.

Studierea activității proliferative a adenoamelor a fost utilizată pentru a distinge între adenoamele agresive și cele indolente. Aceste studii au arătat că majoritatea tumorilor prezintă un index de proliferare sub 3%. Adenoamele clinic funcționale prezintă o proliferare mult mai mare decât cele nefuncționale. Există o corelație puternică între expresia Ki-67(MIB-1) și capacitatea de invazie a adenoamelor, însă nu s-a demonstrat încă o corelație între indexul proliferativ și recurență. Tumorile care prezintă o activitate mitotică crescută și/sau un indice Ki-67 crescut trebuie să fie desemnate ca adenoame atipice, iar pacienții trebuie urmăriți cu atenție [280].

Patogeneza adenoamelor hipofizare. În pofida investigațiilor impunătoare efectuate, mecanismele implicate în tumorigeneza și evoluția tumorală a adenoamelor sunt puțin cunoscute. Dezvoltarea adenoamelor hipofizare pare a fi un proces multistadial și multicausal în care factorii endocrini, predispoziția genetică și mutațiile somatice specifice pot servi ca factori contributivi. Studiile genetice au demonstrat că majoritatea tumorilor au o origine monoclonală. Două anomalii genetice bine caracterizate, au fost descrise în adenoamele hipofizare. Prima dintre ele implică pierderea alelică a unei gene de presupusă supresie tumorală de la nivel 11q13, defect genetic întâlnit în sindromul neoplazic endocrin de tip 1 (MEN 1). La pacienții cu

acest sindrom, pierderea 11q13 este prezentă în adenoamele hipofizare, precum și în alte leziuni comune cum ar fi hiperplazia paratiroidiană și tumori endocrine ale pancreasului. Numai 3% din adenoamele hipofizare se dezvoltă în contextul acestui sindrom, astfel încât gena MEN1 nu este un factor major în dezvoltarea adenoamelor sporadice. Totuși pierderea heterogenică la 11q13 a fost demonstrată în 10-20% din adenoamele sporadice, sugerând localizarea genei supresoare la acest nivel [250].

A doua mutație genică, descrisă în adenoamele hipofizare este cea a oncogenei *gsp*, determinând o mutație în subunitatea α a proteinei G ($G\alpha$). $G\alpha$ este o proteină stimuloare a adenilat ciclazei în somatotrofe, cuplată cu receptorul pentru GHRH la nivelul membranei celulare. GHRH induce transcripția genei pentru producția și secreția STH. Această proteină mutantă determină inhibarea activării guanozin-trifosfatazei, menținând sistemul adenilat ciclazei într-o continuă activare, mimând efectele GHRH la nivelul membranei celulare. Mutația *gsp* a fost identificată în 40% din adenoamele secretante de STH. Deși, au fost identificate diferențe clinice și biochimice în tumorile cu această mutație, ele nu diferă din punct de vedere morfologic față de tumorile STH secretante fără mutația *gsp*. Mutația oncogenei *gsp* este foarte rară în alte subtipuri de tumori hipofizare, întâlnindu-se și în 10% din tumorile nefuncționale și 5% din cele secretante de ACTH. Această mutație reprezintă de asemenea baza sindromului McCune-Albright care se caracterizează prin hiperplazie somatotropă și o displazie fibroasă a oaselor [169].

Un număr de alte oncogene și gene supresoare tumorale au fost identificate ca posibili factori ai genezei tumorale hipofizare. Gena de transformare tumorală a hipofizei (PTTG) transcrie o proteină multifuncțională cu rol în controlul mitozelor, transformarea celulară, repararea ADN-ului și reglarea genică. Au fost identificate trei gene homologe: (1)PTTG1 la 5p33, (2)PTTG2 la 4p12 și (3)PTTG3 la 8q22. Această proteină se exprimă la nivele scăzute în numeroase țesuturi, incluzând și hipofiza. Se exprimă însă abundent într-o varietate de tumori solide, precum și în adenoamele hipofizare. Expresia PTTG a fost demonstrată în toate subtipurile de adenoame hipofizare, secretante sau nesecretante. S-a demonstrat că PTTG participă la inițierea și progresia tumorală prin mecanisme care implică fosforilarea PTTG de către un ciclu celular kinazo-dependent, interacțiunea cu factori de creștere, îndeosebi FGF-2 și stimularea angiogenezei[240].

Mutația protooncogenei H-ras a fost identificată în trei metastaze ale carcinoamelor hipofizare și într-un singur prolactinom agresiv. Mutația genei de supresie tumorală TP53 este cea mai comună în cancerle umane. Totuși, se pare că acesta nu joacă un rol major în geneza

tumorilor hipofizare. Nici mutația TP53, nici deleția 17q nu au fost demonstrate în adenoamele și carcinoamele hipofizare. Studii imunohistochimice pentru produsul genei TP53 au arătat o expresie crescută a proteinei p53 într-un număr crescut de adenoame și carcinoame invazive, sugerând că alte mecanisme decât mutația genică pot fi implicate în expresia proteică crescută.

Examinarea numeroaselor adenoame nu a reușit să stabilească mutații ale genei de supresie tumorală RB. Totuși, pierderea alelică a RB a fost demonstrată în câteva adenoame invazive și carcinoame hipofizare.

În concluzie, aceste rezultate sugerează că, chiar dacă mutațiile la nivelul PTTG, H-ras, RB și TP53 nu sunt direct asociate cu geneza tumorală hipofizară, aceste oncogene și gene de supresie tumorală pot juca un rol important în progresia carcinoamelor și a metastazelor lor. Un număr de factori de creștere și factori trofici hipotalamici sunt de asemenea suspectați pentru participarea lor în menținerea tumorilor hipofizare prin mecanisme autocrine și paracrine [176].

Tipuri de adenoame

Adenoamele cu secreție de prolactină (PRL). Așa-numitele prolactinoame reprezintă aproape 80% din tumorile hipofizare funcționale și aproximativ 40-50% din totalul adenoamelor. Datorită tendinței de a controla medicamentos aceste adenoame cu agoniști de dopamină, frecvența prolactinoamelor în practica chirurgicală este în scădere. Multe din prolactinoame sunt microadenoame, care apar în perioada reproductivă la femei, acestea prezentând de obicei amenoree, galactoree și infertilitate. Macroadenoamele (>1cm) apar numai la 30% din femeile hiperprolactinemice. La bărbații și femeile mai în vârstă prolactinoamele sunt de obicei macroadenoame și se asociază mai des cu cefalee, defecte neurologice și pierderea vederii. Impotența și diminuarea libidoului sunt manifestări comune la bărbați. Diagnosticul de prolactinom este confirmat prin hiperprolactinemie susținută și de aspectul neuroradiologic al tumorii.

În microscopia optică, celulele tumorale au mărime medie cu citoplasma cromofobă sau ușor acidofilă și un nucleu oval situat central. Mici nucleoli pot fi prezenți. Aproximativ 10-20% din cazuri prezintă microcalcificări, care uneori sunt așa abundente încât pot apărea așa-zisele „pietre hipofizare”. Prolactinoamele pot produce o substanță amiloid-like, formând mici corpi hialini. Calcificările și corpii amiloizi nu sunt patognomonici, dar apar mai frecvent în prolactinoame decât în alte tipuri de adenoame.

Imunohistochimia arată pozitivitatea lor la PRL. Pattern-ul colorației este foarte caracteristic, cu o localizare perinucleară și aspect punctiform. Acest pattern a fost numit de unii autori pattern „Golgi”, reflectând localizarea hormonului în complexul Golgi.

Majoritatea pacienților cu prolactinoame au fost tratați înainte de intervenția chirurgicală cu agonști de dopamină. Efectele morfologice ale acestor medicamente sunt prezente în marea majoritate a pieselor chirurgicale. Acești agenți produc atrofia celulelor lactotrofe, rezultând în micșorarea dimensiunilor tumorii. Acestea devin mai mici, prin reducerea citoplasmei, iar nucleii devin hipercromatici. În plus, pot apărea grade variate de fibroză interstițială datorită acestor agenți medicamentoși. Aspectele ultrastructurale ale prolactinoamelor sunt bine caracterizate. Prolactinoamele se împart în cele cu granulații dense și cele cu granulații rare. Adenoamele cu granulații rare sunt mai des întâlnite și celulele lor seamănă cu celulele lactotrofe din hipofiza normală. Celulele adenomatoase se caracterizează printr-o rețea proeminentă de reticul endoplasmatic rugos (RER), un remarcabil complex Golgi și un mic număr de granule secretorii. Are loc o exocitoză aberantă, granulele părăsind celula la nivelul suprafețelor laterale, proces tipic acestor tumori. Utilitatea ME în prolactinoame este sub semnul întrebării, deoarece deosebirea între aceste două subtipuri de adenoame nu are valoare clinică [125].

Adenoame secretante de STH. Aproximativ 20% din adenoamele hipofizare se asociază cu evidențe clinice sau imunohistochemice de secreție de STH. Adenoamele secretante de STH sunt însoțite de valori serice crescute ale STH și ale factorului de creștere insulin-like 1 (IGF-1), precum și de semne și simptome ale acromegaliei și/sau gigantismului. Acromegalia afectează ambele sexe cu o incidență similară și având o vârstă medie de 40-45 de ani. Simptomele progresează de obicei lent, întârzierea diagnosticării fiind în medie 7-10 ani. Mai puțin frecvent, secreția de STH produce gigantism, acesta dezvoltându-se când adenomul apare înainte de închiderea cartilajelor de creștere, în copilărie și adolescență. Mulți pacienți acromegalici prezintă macroadenoame în momentul diagnosticului, multe dintre acestea fiind expansionate supraselar sau invadează spațiul paraselar. În consecință, apar simptome secundare expansiunii masei tumorale, incluzând cefalee și tulburări de vedere. La aproximativ 30-50% din pacienți, dubla secreție de STH și PRL duce la apariția semnelor și simptomelor de hiperprolactinemie [163].

Adenoamele secretante de STH sunt atât eozinofile cât și cromofobe pe colorațiile uzuale. Această variație histologică este atribuită cantității variabile de granule secretorii prezente în citoplasma celulelor. În adenoamele eozinofile, citoplasma are o granularitate crescută, observată mai bine în ME. Nucleii sunt ovali, prezintă nucleoli și sunt situați central. În tumorile cu puține granule secretorii, așa numitele adenoame cu granulații rare, citoplasma tinde să fie cromofobă, iar nucleii sunt situați excentric. În citoplasma există structuri paranucleare eozinofilice, așa numiții „corpi fibroși”, care reprezintă acumulări de filamente intermediare și formațiuni tubulare [221].

Colorațiile imunohistochimice prezintă în diferite grade imunoreactivitatea STH. În adenoamele eozinofile, reactivitatea STH este difuză, ocupând întreaga citoplasmă a celulelor. În contrast, în cele mai multe adenoame cromofobe, reactivitatea STH este focală, având o localizare paranucleară, similară cu paternul Golgi al prolactinoamelor. În plus, în adenoamele cu granulații rare, corpii „fibroși” sunt puternic pozitivi pentru citokeratine. Imunoreactivitatea pentru PRL poate fi focală, fără ca pacienții să prezinte tablou clinic de hiperprolactinemie. Mai poate fi demonstrată și imunoreactivitatea pentru alți hormoni ca β -FSH, β -LH, α -SU și mai puțin frecvent β -TSH.

Cele două subtipuri de adenoame secretante de STH sunt ușor de identificat prin analiza ultrastructurală. Subtipul cu granulații dense este format din celule adenomatoase care amintesc de somatotrofele normale și care se caracterizează printr-o bogată rețea de RER, complexe Golgi proeminente și numeroase granule secretorii. Celule cu granulații rare diferă de aspectul somatotrofelor normale, prezentând o moderată rețea de RER și complexe Golgi și un mic număr de granule secretorii. Aspectul caracteristic al acestui subtip este dat de prezența acelor corpi „fibroși”. Distincția acestor subtipuri prin analizarea ultrastructurii nu este neapărat necesară. Includerea citokeratnelor în panel-ul imunohistochimic poate confirma prezența „corpilor fibroși”. Importanța clinică în diferențierea celor 2 subtipuri este controversată. Se pare că subtipul cu granulații rare prezintă un tablou clinic mai agresiv și o tendință de invazie locală mai ridicată.

Ca și în prolactinoame, acromegalia dispune de tratament medicamentos pe termen lung cu analogi de somatostatina (ex. Octreotid). Acești agenți pot schimba morfologia adenoamelor; cea mai comună modificare fiind apariția fibrozei perivascular și interstițial [279].

Adenoamele cu secreție mixtă STH/PRL. În acest grup de adenoame există trei tipuri tumorale care secretă simultan STH și PRL: adenomul cu celule somatotrofe și celule lactotrofe, adenomul cu celule mamosomatotrofe și adenomul acidofil cu celule stem. Aceste tipuri tumorale trebuie investigate atât imunohistochimic cât și ultrastructural, deoarece diferențierea lor are implicații clinice și prognostice. Primele două tipuri au tendința de a se dezvolta lent în comparație cu adenoamele acidofile cu celule stem. Aceste tumori mixte au un comportament mai agresiv decât adenoamele cu secreție pură de STH.

Adenomul cu celule somatotrofe și celule lactotrofe. Aspectul clinic predominant al acestor tumori este acromegalia. Semnele și simptomele hiperprolactinemiei nu sunt întotdeauna prezente. Histologic tumorile sunt similare adenomului STH-secretant, având un aspect eozinofil/cromofob. Cele două tipuri celulare formează grupuri sau sunt dispersate. La nivel

ultrastructural, aceste adenoame sunt bimorfe, fiind constituite din două populații celulare: celule cu granulații dense sau rare, secretante de STH și PRL [180].

Adenomul cu celule mamosomatotrofe. Aceste tumori cu celule cu secreție dublă reprezintă sub 2% din adenoamele hipofizare și aproximativ 8% din tumorile care asociază acromegalie. La fel ca și primul tip, acesta se asociază mai des cu acromegalia și nivele crescute de STH, hiperprolactinemia fiind mai puțin întâlnită. Histologic aceste adenoame sunt acidofile pe H&E, iar imunohistochimia demonstrează prezența STH și PRL în citoplasma aceleiași celule adenomatoase. Analiza ultrastructurală demonstrează o bună diferențiere a celulelor mamosomatotrofe care prezintă aspecte ale celulelor secretante de STH și de PRL. Celulele sunt în mare parte similare cu cele cu granulații dense secretante de STH, dar cu granulele iregulate și de mărimi variabile (20-2000nm). Expulzia granulelor și depozitele extracelulare de material secretat prezintă caracteristic un aspect comun celulelor diferențiate pentru secreția de PRL [187].

Adenomul acidofil cu celule stem. Acest subtip neobișnuit de adenom mixt este foarte rar. Spre deosebire de celelalte două subtipuri, aceste adenoame se asociază cu grade diferite de hiperprolactinemie. Acromegalia este rară, iar nivelul seric al STH este de cele mai multe ori normal. Majoritatea acestor tumori sunt macroadenoame cu potențial invaziv crescut. Deoarece mulți dintre pacienți prezintă aspecte clinice de hiperprolactinemie, diagnosticul are importanță clinică și nu trebuie făcută confuzia cu un prolactinom normal. În microscopia optică, celulele stem sunt acidofile sau cromofobe cu modificări oncocitice focale în citoplasmă. Imunoreactivitatea pentru PRL, și mai puțin pentru STH este prezentă în citoplasma aceluiași celule adenomatoase. ME este necesară pentru diagnosticul acestui tip de adenom. Întâlnim o populație de celule imature care prezintă aspecte ale celulelor cu granulații rare secretante de STH și de PRL. Modificările oncocitice cu prezența mitocondriilor de mari dimensiuni apar în majoritatea cazurilor [126].

Adenoamele secretante de ACTH. Sindromul Cushing endogen poate rezulta prin două mecanisme:

- ACTH-dependent, datorită unui exces de ACTH de la nivelul glandei hipofizare sau din tumori ectopice secretante de ACTH.
- ACTH-independent, datorită unei secreții autonome de cortizol de către tumori adrenaliene.
- Sindromul Cushing ACTH-dependent reprezintă aproximativ 85% din cazurile

endogene și este cauzat de adenoamele hipofizare în proporție de 80%. Un număr foarte mic de pacienții prezintă tumori cu secreție de CRH, în special tumori carcinoide. Convențional, sindromul Cushing determinat de tumori hipofizare a fost numit boala Cushing.

Adenoamele secretante de ACTH constituie două grupuri majore:

- Tumori cu activitate endocrină asociate cu boala Cushing sau cu sindromul Nelson.
- Tumori nefuncționale clinic-așa numitele adenoame corticotrofe silențioase.

Adenoamele ACTH secretante asociate cu boala Cushing reprezintă aproximativ 10-15% din toate adenoamele. Foarte rar, o hiperplazie a celulelor corticotrofe poate fi sursa bolii Cushing. Ea afectează pacienți de diferite vârste, între 30 și 40 de ani, fiind mult mai frecventă în rândul femeilor (F:B=8:1). Boala Cushing în copilărie este rară și posedă o agresivitate mai sporită decât la adulți. În comparație cu adulții, boala apărută prepubertar este mai frecventă la sexul masculin.

Marea majoritate a adenoamelor secretante de ACTH sunt microadenoame și aproximativ 15% sunt invazive în momentul intervenției chirurgicale. Adenoamele secretante de ACTH sunt de obicei bazofile pe H-E și puternic PAS-pozitive. Citoplasma este foarte granulată și nucleii sunt largi cu cromatina în blocuri și nucleolii proeminenți. Un anumit grad de pleomorfism nuclear poate fi prezent. Celulele au membranele citoplasmice distincte și tind să se atingă unele pe altele, având aspectul unui pavaj (tile-like). Formațiunile papilare sunt de asemenea foarte caracteristice. Adenoamele cromofobe cu citoplasmă săracă în granule sunt și ele întâlnite.

Ocazional, citoplasma prezintă la periferie un material de tip de hialin/like, dând aspectul de celulă "țintă", reprezentând transformarea hialină Crooke. Acest material hialin corespunde unei acumulări de filamente de citokeratină și pare a fi efectul cortizolului seric crescut pe celulele hipofizare. Transformarea hialină Crooke este prezentă de asemenea în hipofiza normală a pacienților cu sindrom Cushing sau în oricare altă stare patologică cu un statut de hipercortizolemie. Adenoamele corticotrope prezentând transformare hialină extensivă sunt cele cu invazie locală și recurență crescută.

Adenoamele asociate sindromului Nelson (reprezintă un exces de cortizol fără a se decela o leziune hipofizară la examenul radiologic, cu indicație inadecvată de suprarenalectomie, iar apoi se descoperă adenomul hipofizar) se aseamănă din punct de vedere histologic cu cele din boala Cushing, cu excepția că transformarea hialină Crooke nu este prezentă. Studiile imunohistochimice demonstrează prezența în grade variate a ACTH. În plus și alte peptide sunt

prezente, precum precursori ai POMC: β -lipoprotein, β -endorfina și hormonul stimulator melanocitar.

Aspectele ultrastructurale ale acestor adenoame se caracterizează printr-o bună diferențiere semănând cu celulele corticotrofe normale. Organitele bine dezvoltate, incluzând RER, complex Golgi se asociază cu numeroase granule secretorii largi de diferite forme [181].

Adenoamele corticotrofe silențioase. Această variantă de adenoame se caracterizează printr-o imunoreactivitate la ACTH, în ciuda faptului că pacienții nu au nici un semn clinic al bolii Cushing și nici nivele serice care să ateste excesul de ACTH. Deoarece adenoamele silențioase sunt nefuncționale clinic, majoritatea sunt macroadenoame, iar pacienții prezintă semne și simptome determinate de formațiuni de volum. Caracteristic acestor adenoame este tendința ridicată pentru hemoragie și apoplexie, fenomene întâlnite la o treime din pacienți.

Au fost descrise două tipuri de adenoame silențioase. Subtipul 1 este similar histologic cu adenoamele din boala Cushing. Totuși, acest subtip se întâlnește la persoanele mai în vârstă. Subtipul 2 se prezintă diferit din punct de vedere histologic. Acestea sunt amfofile sau ușor bazofile și seamănă mai mult cu adenoamele nefuncționale cu celule "nule". Imunohistochimia demonstrează prezența ACTH și a peptidelor precursorilor POMC. Ultrastructura este mai puțin caracteristică adenoamelor corticotrofe tipice.

Fenotipul celulelor normale din care derivă adenoamele silențioase nu este încă elucidat. Se presupune ca celulele bazofile din lobul posterior, similare ca morfologie cu corticotrofele din lobul anterior, pot fi potențiale progenitoare pentru adenoamele silențioase de tip 1 [130].

Adenoame secretante de hormoni gonadotrofi. Spre deosebire de celelalte tumori secretante, adenoamele gonadotrope nu realizează de obicei un tablou clinic determinat de producția hormonală în exces. Producția de hormoni a acestor tumori este inefficientă, iar detecția lor în ser este o provocare. Cu ajutorul noilor tehnici de laborator s-a observat ca un mare număr de adenoame, încadrate inițial ca nefuncționale, produc hormoni gonadotrofi sau precursori ai acestora. Pe baza acestor studii, adenoame gonadotrope reprezintă o mare parte din adenoamele non-funcționale clinic și aproximativ 20% din toate adenoamele.

Aceste adenoame apar mai frecvent la persoane în decada a 6-a și mai bătrâni, cu o incidență mai mare la sexul masculin. Tipic acestor adenoame nefuncționale clinic sunt simptomele determinate de efectul de masă. Apar tulburări de vedere, cefalee, hipopituitarism, scăderea libidoului și pareze de nervi cranieni. Scăderea câmpului vizual se datorează extensiei supraselare și compresiunii pe chiasma optică, aceasta apărând în peste 70% din cazurile de adenoame gonadotrope.

În microscopia optică, multe dintre adenoamele gonadotrope au o citoplasmă cromofobă și nucleii prezintă un pattern fin al cromatinei. Celulele tumorale pot fi dispuse și într-un pattern difuz, însă caracteristic acestor adenoame este pattern-ul papilar. Imunohistochimia demonstrează grade variate de reactivitate pentru β -FSH, β -LH, α -SU sau combinații ale acestor hormoni. Celulele imunoreactive pot fi împrăștiate în tot adenomul, dar de obicei ele se întâlnesc în grupuri. Imunoreactivitatea pentru β -FSH pare să fie mai des întâlnită, cu o distribuție mai mare decât celelalte glicoproteine.

Intrastructural, aceste adenoame se caracterizează prin celule alungite ce conțin un număr redus de granule secretorii mici (50-200 nm). Granulele secretorii sunt distribuite inegal în citoplasmă sau mult mai des, tind să se localizeze de-a lungul membranei citoplasmatică. A fost descrisă o deosebire între sexe: în majoritatea adenoamelor la femei apare o transformare vacuolară tipică a aparatului Golgi, dând un aspect de „fagure de miere” [278].

Adenoamele cu celule „nule” și oncocitoamele. Aproximativ 20% din adenoame nu prezintă clinic, și nici imunohistochimic, vreo evidență că ar produce un anumit tip de hormon. Denumirea de adenom cu celule „nule” se bazează în mare parte pe absența aspectelor ultrastructurale de diferențiere specifică. Aceste adenoame se dezvoltă în aceleași circumstanțe clinice ca și adenoamele gonadotrope, determinând în timp semne și simptome datorate masei tumorale. Mai specific este apariția lor la femei în postmenopauză și la bărbații în vârstă, iar o mare parte din tumori se prezintă ca macroadenoame. Tumori de mici dimensiuni pot fi decelate accidental în urma unui examen RMN.

În microscopia optică majoritatea au citoplasma cromofobă. La fel ca adenoamele gonadotrope, ele pot avea un pattern difuz sau unul papilar bine definit. Degenerarea oncocitică poate fi întâlnită într-un procent din cazuri (oncocitoamele). În multe cazuri s-a observat o imunoreactivitate focală și slabă pentru β -FSH, β -LH și/sau α -SU. Prezența acestor hormoni este coroborată cu expresia ocazională a genelor responsabile de producția lor și secreția unor cantități mici de hormon în culturile celulare. Ultrastructural, se observă o dezvoltare redusă a organitelor celulare în asocieră cu numai câteva granule secretorii. În tumorile cu degenerare oncocitică se observă o abundență de mitocondrii.

Citogeneza acestor tumori este încă necunoscută. Deoarece multe adenoame cu celule „nule” pot prezenta imunoreactivitate focală pentru β -FSH, β -LH și/sau α -SU, se presupune că există o oarecare suprapunere între aceste adenoame și cele gonadotrope. Criteriile de diferențiere între aceste două tipuri sunt încă controversate. Totuși, slaba diferențiere a organitelor în adenoamele cu celule „nule”, le diferențiază oarecum de adenoamele gonadotrope.

Aceste două tipuri de tumori pot avea aceeași celulă progenitoare care are o capacitate de diferențiere cu spectrul larg [159].

O variantă distinctă și neobișnuită de tumoră oncocitică este *oncocitomul cu celule fusiforme*. Aceasta leziune intră des în diagnosticul diferențial al astrocitomului de hipofiză posterioară și se caracterizează prin celule fusiforme, bogate în mitocondrii, care sunt pozitive la proteina S-100 și EMA, dar negative la GFAP și merkeri neuroendocrini. O posibilă origine în celulele foliculostelate a fost propusă pentru aceste celule [268].

Adenoamele secretante de TSH. Adenoamele tireotrope sunt pe ultimul loc ca frecvență. Aceste tumori pot fiacompaniate de un nivel foarte ridicat al TSH-ului și hipertiroidism, dar pot exista și cazuri cu hipotiroidism sau eutiroidie. Multe dintre ele sunt macroadenoame invazive.

Celulele adenomatoase tireotrofe sunt frecvent cromofobe în microscopia optică. Adenoamele sunt de obicei compuse din celule alungite, angulate sau neregulate. Imunohistochimia decelează TSH în cantități variabile la nivel citoplasmatic. α -SU este de asemenea pozitiv. În microscopia electronică, celulele sunt moderat diferențiate, cu rețele reduse de RER și complexe Golgi. Granulele secretorii sunt mici (100-200nm), sferice și uniform electronodense, și de cele mai multe ori dispuse în apropierea membranei citoplasmatică. Diagnosticul acestor adenoame este problematic dacă aspectul clinic și imunohistochimic sunt nerelevante. În acest caz, ME este de elecție pentru un diagnostic cât mai precis [114].

Adenoamele plurihormonale. Adenoamele plurihormonale sunt entități rare care prezintă imunoreactivitate la mai mulți hormoni hipofizari și nu corespund cu citogeneza normală a hipofizei anterioare. Datorită rarității acestor tumori, aspectul clinic nu este bine caracterizat. Totuși, multe din cazurile raportate în literatură au prezentat simptome prin efectul de masă datorită dimensiunilor crescute în momentul diagnosticului. Aceste adenoame pot fi monomorfe sau polimorfe. Cele monomorfe sunt constituite dintr-un singur tip celular care produce doi sau mai mulți hormoni. Plurimorfele conțin două sau mai multe tipuri de celule [18].

Orice combinație hormonală poate fi posibilă; totuși, aceste adenoame nu includ combinațiile: (1)STH,PRL și TSH;(2)FSH și LH. Combinații între FSH și GH sau PRL și TSH au fost raportate. Foarte rar au fost raportate adenoame plurihormonale pozitive pentru ACTH. A fost descrisă o variantă rară de adenom corticotrop care prezintă imunoreactivitate pentru α -SU. Acesta din urmă prezintă un grad crescut de recurență și o evoluție agresivă [127].

1.3. Factorii predictivi pentru diagnosticul și terapia adenoamelor hipofizare

Adenoamele hipofizare pot crește fie expansionându-se, fie invadând structurile adiacente. În primul caz, tumorile sunt mici, bine delimitate și restricționate în șaua turcească. Adenoamele invazive au de obicei o creștere rapidă, invadând țesuturile vecine ca sinusul sfenoid, sinusul cavernos și în unele cazuri chiar țesutul cerebral.

Mecanismul invaziv al acestor adenoame agresive nu este încă înțeles pe deplin. Proliferarea continuă de la adenom la adenom invaziv și carcinom nu a fost demonstrată în marea majoritate a tumorilor. Tendința de infiltrare locală și invazie a țesuturilor adiacente a adenoamelor hipofizare pare a nu se corela cu aspectele histologice ale tumorii. Adenoamele invazive nu trebuie să prezinte neapărat aspecte histologice de agresivitate incluzând pleomorfismul, atipia nucleară și activitate mitotică. Chiar dacă atât adenoamele funcționale, cât și cele nefuncționale se pot prezenta ca tumori invazive, s-a observat că cele funcționale au această proprietate mult mai des. Studiarea activității proliferative a adenoamelor a fost utilizată pentru a distinge între adenoamele agresive și cele indolente. Aceste studii au arătat că majoritatea tumorilor prezintă un index de proliferare sub 3%. Adenoamele clinic funcționale prezintă o proliferare mult mai mare decât cele nefuncționale. Există o corelație puternică între expresia Ki-67 (MIB-1) și capacitatea de invazie a adenoamelor, însă nu s-a demonstrat încă o corelație între indexul proliferativ și recurența tumorilor. Tumorile care prezintă o activitate mitotică crescută și/sau un indice Ki-67 crescut trebuie să fie desemnate ca adenoame atipice, iar pacienții trebuie urmăriți cu atenție [280].

Recent, Ki67 nu mai este studiat separat în adenoamele hipofizare ci în corelație cu alți factori care stimulează proliferarea și tumorigeneza formațiunilor de volum pituitare. Astfel implicarea concertată a Ki67 și a p53 în patogeneza adenoamelor hipofizare recurente și agresive pare să fie legat de o instabilitate genetică ridicată în grupul acestor adenoame pituitare.

Antigenul Ki67 reflectă starea de proliferare a celulelor tumorale în acel moment mai degrabă decât rata de proliferare celulară. Antigenul a fost dovedit a fi puternic corelat cu expresia timidinei și determinări de citometrie de flux de fracțiuni de fază. Primele rapoarte ale indicelui Ki 67 evaluat în mod special în adenoamele hipofizare s-a realizat pe material congelat sau proaspăt, în timp ce materialul încorporat în parafină a fost folosit mai târziu. În ceea ce privește identificarea antigenului, Key et al. a raportat trei anticorpi ca variante recombinante ale antigenului (MIB 1-3) Ki 67 și le caracterizează ca adevărați echivalenți de Ki 67 [153]. Alte studii au confirmat validitatea rezultatelor comparativ cu anticorpii menționați. Din 1995, în literatura de specialitate au fost raportate discuții de evaluare a MIB - 1 în tumori hipofizare. În

studiile lui Knsop și colab., Zhao și colab. și Mastronardi colab, reacția pozitivă medie a Ki 67 a fost de 1,1, 1,4, și 2,64 %, respectiv. În alte studii, reacția medie la MIB - 1 a fost de 1,22 % [154, 191, 347]. La examinarea de țesut proaspăt și material la parafină, sunt găsite cazuri negative pentru Ki67, precum și cazuri cu procente care se abat semnificativ de la medie. Folosind MIB - 1 în secțiunile înglobate în parafină, au fost raportate valori de 3,6 până la 16,4%. Alți autori au raportat valori de 16,45 % și chiar 23.37 % [244], în seriile lor, valori care sunt de obicei găsite în carcinoamele hipofizare.

În 2004, OMS a dezvoltat o nouă clasificare pentru adenoamele atipice, pe baza markerilor tumorali care se corelează cu agresivitatea tumorilor hipofizare, inclusiv carcinoame hipofizare. Cea mai nouă denumire servește ca un intermediar între adenoamele hipofizare tipice și carcinoame, acestea din urmă sunt rar întâlnite și cuprind mai puțin de 1 % din totalul adenoamelor hipofizare primare. Potrivit clasificării recente a OMS, criteriile de diagnostic pentru adenom atipic includ supraexpresia p53, MIB - 1 mai mare de 3 %.

Ki- 67 LI > 1,3 %, a fost găsit de către Gejman et. al. ca factor predictiv cu o mare specificitate pentru adenoamele hipofizare [267]. Capacitatea predictivă pentru agresivitate este în general mai mare în adenoamele secretorii cum ar fi prolactinoamele (care prezintă o cea mai mare parte a adenoamelor hipofizare cu LI crescut și utilizând pragul de 3 % pentru caracterul invaziv s-a obținut o specificitate de 97,3 % și o sensibilitate de 73 %).

Righi și colab. au raportat recent că pragul utilizat în mod obișnuit pentru Ki67 de 3% are o specificitate mare (89,5 %), dar o sensibilitate scăzută (53,8 %) [265]. Folosind analiza de imagine, au descoperit că Ki67 LI este un factor de prognostic util în adenoamele hipofizare non-funcționale, ACTH, și adenoamele PRL, dar cu praguri diferite. Adenoamele de tip null cell adenoma sunt de două tipuri: (a) adenoame și (b) adenoame ne invazive caracterizate prin Ki-67 mai mare de 1,95 %. Pentru adenoamele PRL pozitive a fost identificat doar 1 subgrup cu un risc ridicat de recurență / progresie: adenoame cu Ki67 mai mare de 4,40 %. Adenoamele funcționale ACTH cu Ki 67 mai mare de 1,70 % a caracterizat subgrupul cu un risc ridicat de reapariție / progresie.

Diferitele tehnici de măsurare LI (analiza imaginii vs manuală), precum și heterogenitatea tumorală și variabilitatea între observatori sunt factori care pot afecta această analiză.

Proteina S100 și proteina glială fibrilară acidă (GFAP) în adenoamele hipofizare sunt puțin studiate. Expresia lor în țesutul hipofizar este limitată la descrierea în celulele follicular stellate precum și în legătură cu celulele stem din hipofiza anterioară. Celulele follicular stellate au fost raportate ca fiind reactive în adenoamele hipofizare și având o heterogenitate de expresie

a proteinei S100 și a GFAP, astfel au fost definite subgrupe cu fenotipuri diferite. Expresia proteinei S100 și a GFAP în celulele tumorale ale adenoamelor hipofizare este foarte puțin studiată și implicarea acestor factori în evoluția și patogeneza adenoamelor hipofizare este foarte puțin corelată cu alți factori prognostici sau cu rol terapeutic studiați anterior în adenoamele hipofizare. În baza datelor disparate din literatură, cercetările desfășurate în cadrul prezentei lucrări au fost inițiate cu scopul de a elucida implicarea celor doi markeri în evoluția și prognosticul adenoamelor hipofizare și corelația expresiei acestora cu factorii de creștere.

1.4. Implicarea factorilor de creștere și a receptorilor corespondenți în patologia adenoamelor hipofizare

VEGF-A (VEGF) este membrul unei familii de citokine strâns înrudite, cu atribuții primordiale în vasculogeneză, angiogeneză fiziologică, patologică și limfangiogeneză. VEGF-A este membru al unei familii de glicoproteine dimerice care aparțin superfamiliei PDGF (factorul de creștere derivat din plachete) de factori de creștere. Alți membri ai familiei includ: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E și PlGF (factorul de creștere placentar). PlGF este exprimat în placentă, având totodată rol accesoriu în angiogeneza patologică prin potențarea activității VEGF-A [115]. VEGF-B ar avea rol în dezvoltarea arterelor coronare [146]. VEGF-C se leagă de VEGFR-3, care este exprimat pe endoteliu limfatic și este implicat în limfangiogeneză. VEGF-D este un factor mitogen al celulelor endoteliale, interacționând cu VEGF-2 și VEGF-3. VEGF-E, codificat de virusul orf, induce angiogeneza prin legarea de VEGFR-2 [206]. Cele două activități biologice principale ale VEGF- activitatea mitogenă și activitatea de inducere a permeabilității vasculare - au fost descrise separat și denumite autonom ca și factorul de permeabilitate vasculară VEGF (factorul de creștere endotelial vascular). Eliberarea unui agent de inducere a permeabilității vasculare de către celulele hepatocarcinomului de porc de guinea a fost raportată în 1979 [74]. Acest factor a fost ulterior denumit factorul de permeabilitate vasculară-VPF [283]. sau vasculotrofină [248]. Activitatea mitogenă a acestui agent pentru celulele endoteliale a fost utilizată pentru a-i monitoriza purificarea iar pe baza selectivității sale pentru celulele țintă, agentul purificat a fost denumit VEGF [84, 104]. VEGF este un mitogen puternic și specific pentru celulele endoteliale ale sistemelor circulator și limfatic [11, 17, 46]. fiind secretat de mai multe tipuri de celule: limfocite T, monocite, macrofage, plachete activate, fibroblaste, celule muscular netede și cel mai important de celule neoplazice [220, 263, 269, 293]. VEGF-A este supraexprimat în majoritatea cancerelor umane solide dar ar apărea și în limfoame și alte malignități hematologice [38, 75, 291]. VEGF-A este supraexprimat nu doar de celule canceroase invazive dar și de unele leziuni premaligne (de exemplu leziuni precursor de cancer de sân, col uterin, colon), nivelele de expresie crescând direct proporțional cu progresia malignă [29, 110, 332]. Adenoamele pituitare și hemangioamele benigne rar supraexprimă VEGF-A, spre deosebire de tumorile vasculare maligne și leiomiomele uterine.

Deși celulele maligne sunt responsabile în principal pentru expresia VEGF-A în tumori, celulele stromale și chiar și endoteliul vascular pot exprima VEGF-A, dar în cantități mai mici, în special în condiții de hipoxie [70, 91, 122, 219].

Expresia VEGF în adenoamele hipofizare. VEGF-A este o glicoproteină dimerică, catenele căreia sunt legate printr-o legătură disulfidică, cu o masă moleculară de 34-45 kDa [83, 98]. Gena pentru VEGF-A este localizată pe cromozomul 6, fiind format din 8 axoni; prin procesul de splicing alternativ se obțin mai multe izoforme diferite. Cele mai proeminente izoforme codifică în celulele umane polipeptide a câte 189, 165 și 121 de aminoacizi. VEGF-A165, este forma predominantă și nu conține aminoacizii codificați de exonul 6. Aceste izoforme au proprietăți fizice diferite: VEGF-A 121 este solubilă și nu leagă heparina. Izoformele VEGF-A 165 și 189 au sarcină bazică crescută și leagă heparina cu afinitate crescută. VEGF-A165 a fost purificat inițial pe baza afinității pentru heparină [283, 285]. Heparina, heparan-sulfatul și heparinaza dislocă izoformele mai mari ale VEGF-A de pe locurile de legare ale proteoglicanilor; clivajul prin plasmină de asemenea activează izoformele prin eliberarea lor din celule sau din matrice [131]. În ciuda diferențelor fizice, izoformele VEGF-A au activități biologice aparent identice când sunt libere în soluție. VEGF-A își mediază efectele prin legarea de 2 receptori transmembranari tirozin-kinazici cu afinitate crescută, care sunt exprimați selectiv dar nu exclusiv pe endoteliul vascular: VEGFR-1 (Flt-1) și VEGFR-2 (KDR, Flk-1), ce sunt supraexprimați în vascularizația tumorală care exprimă VEGF-A [284] și au 7 domenii extracelulare immunoglobulin-like [68, 298]. Există de asemenea o formă trunchiată a VEGFR-1 în ser, care își păstrează activitatea de legare a VEGF-A. Șoarecii nuli pentru VEGFR-1 sau VEGFR-2 sunt embrionic letali. Spre deosebire de VEGF-C și VEGF-D, VEGF-A nu se leagă de VEGFR-3. Recent, un receptor non-kinazic, neuropilina (NRP-1) potențează legarea VEGF-A de VEGFR-2. Neuropilina este mai puțin selectiv exprimată pe endoteliul vascular ca VEGFR-1 și VEGFR-2 iar rolul său în angiogeneza tumorală este sub investigație [207, 208]. Deși VEGF se leagă de VEGFR-1 cu o afinitate de 10 ori mai mare ca a VEGFR-2, acesta mediază în principal semnalizarea VEGF în celulele endoteliale [296]. VEGFR-2 este responsabil pentru medierea permeabilității microvasculare și pentru proliferarea și migrarea celulară. VEGFR-1 ar avea un rol independent în a stimula motilitatea celulară și a atenua unele căi de semnalizare și efectele biologice ale VEGFR-2 [33, 36, 52, 99, 342].

VEGF-A crește permeabilitatea microvasculară, mai ales la nivel de venule postcapilare și vene mici pentru macromolecule circulante. VEGF-A este unul din agenții de permeabilitate vasculară cei mai potenți, cu o putere de 50.000 de ori mai mare ca cea a histaminei [74, 76, 283]. La nivel molecular, VEGF-A activează transcripția genică în celulele endoteliale, inclusiv factorul tisular procoagulant, proteinele căii fibrinolitice (urokinaza, t-PA, PAI-1, receptorul pentru urokinază), MMP (metaloproteinaze de matrice), transportorul GLUT-1, sintaza oxidului

nitric, mitogeni, factori antiapoptotici (bcl-2, A1, survivină) [31, 75, 83, 97, 291]. VEGF-A este un factor de supraviețuire pentru celulele endoteliale, protejează celulele endoteliale de apoptoză [20] și întârzie senescența celulelor endoteliale [327]. Toate tumorile, fără excepție, care supraexprimă VEGF-A au microvascularizație, ale căror celule endoteliale supraexprimă atât VEGFR-1 cât și VEGFR-2 [28, 29, 31, 30, 110, 116, 291, 117, 246, 247, 330]. Angiogeneza este procesul de dezvoltare de noi vase din vasele sangvine existente și este crucială pentru dezvoltarea embrionului, vindecarea rănilor și ciclul reproductiv al femeii. De asemenea, s-a desemnat importanța angiogenezei în procesul de creștere tumorală și metastazare [87]. Neovascularizația este esențială pentru formarea tumorilor pituitare, VEGF fiind unul dintre cei mai importanți inductori ai angiogenezei. În glanda pituitară umană normală, VEGF-A a fost localizat cu predilecție în celulele corticotrofe, somatotrofe și foliculostelate, înregistrând nivele mai joase și în alte tipuri celulare [315].

De obicei adenoamele pituitare sunt mai puțin vascularizate de cât glanda pituitară normală iar rolul angiogenezei în aceste tumori este la nivel de investigație. Astfel, s-a descris o angieneză lentă în prolactinoame și densități vasculare chiar mai scăzute în adenoamele pituitare umane comparativ cu țesutul pituitar normal [183, 337]. Doar carcinoamele prezintă o creștere clară a densității microvasculare. Un studiu realizat în 2010, pe o serie de 56 de adenoame pituitare înlăturate chirurgical a încercat să determine expresia proteinelor VEGF și CD31, utilizând tehnica Western Blot [37, 183]. Autorii au găsit că expresia proteinei VEGF a fost distribuită neuniform în diferite componente celulare ale adenoamelor hipofizare, după cum au determinat și alți autori. Analiza Western Blot a celor 56 de adenoame pituitare din această serie a evidențiat că expresia proteinei VEGF a fost mai mare în prolactinoame, comparativ cu adenoamele hipofizare nefuncționale, GH și ACTH –secretante. Dar această observație a autorilor poate fi și legată de faptul că un procent mare de adenoame din serie erau de fapt macroprolactinoame. Într-un număr semnificativ de studii anterioare s-a descris faptul că macroprolactinoamele sunt semnificativ mai vascularizate decât microprolactinoamele [307, 308]. Prin tehnica de imunohistochimie, s-a observat un spectru larg de imunoreactivitate pentru VEGF în diferite tipuri de adenoame hipofizare [182, 194, 224]. Viacava et al [311] nu a identificat diferențe în expresia VEGF între tumori hipofizare de histotipuri diferite utilizând imunohistochimia (IHC), în timp ce Lloyd et.al a observat colorație pentru VEGF mai scăzută în glandele normale comparativ cu cea din adenoame, dar nivele mai crescute de expresie a VEGF în carcinoame pituitare [182]. McCabe et al a comparat ARNm pentru VEGF într-o serie de adenoame hipofizare, seria care conținea 77% adenoame pituitare nefuncționale și 4%

prolactinoame; autorul a găsit expresia cea mai înaltă în adenoamele hipofizare nefuncționale și în cele somatotrofe [194]. Rezultatele au fost ulterior confirmate prin tehnica Western Blot, utilizând 20% din eșantioane. Expresia mai scăzută a VEGF în adenoamele ACTH-secretante poate fi și legată de faptul că sinteza de VEGF poate fi inhibată de glucocorticoizi; in vitro glucocorticoizii sunt inhibitori potenți ai sintezei de VEGF [184, 311].

Măsurarea densității vasculare a fost utilizată pentru a investiga angiogeneza în diferite tumori. Aceasta s-a arătat că este o metodă cantitativă utilă pentru a evalua angiogeneza, în ciuda faptului că angiogeneza este un proces dinamic și MVD (densitatea vasculară medie) este o măsură statică. Densitatea microvasculară se corelează cu concentrația și expresia factorilor de creștere proangiogenici, de exemplu VEGF și FGF-2 [303].

Densitatea vasculară a diferitelor tumori a fost evaluată prin numărarea vaselor marcate, utilizând imunohistochimia cu anticorpi direcționați spre diferiți markeri endoteliali, atât în secțiunile înghețate cât și în cele incluse la parafină. Anticorpii cei mai uzuali utilizați includ anticorpii direcționați împotriva antigenelor endoteliale: F8 (Factor 8 related antigen - antigenul înrudit cu factorul 8), CD31 (molecula de adeziune la celula endotelială a plachetelor), CD34, și lectina ulex europaeus aglutinina 1 (UEA1). Acești markeri diferă în sensibilitatea lor de a detecta endoteliul [123, 282]. În ceea ce privește densitatea microvascularizației, rezultatele sunt controversate: unii autori au găsit vascularizație mai dezvoltată în tumorile secretante de prolactină [266, 2308]. și alți autori au găsit că prolactinoamele au avut cea mai mică densitate microvasculară, iar adenoamele TSH-secretante cea mai mare densitate microvasculară [224]. În literatură s-a raportat că tumorile ACTH-secretante au avut cea mai mică densitate microvasculară [138, 308], în timp ce alți autori au observat că adenoamele GH-secretante au avut cea mai mică densitate microvasculară [147, 238, 317], sau cea mai mare [308]. Pentru a face și mai dificilă analiza MVD în adenoamele hipofizare, se adaugă faptul că unii autori nu au găsit diferențe semnificative în densitatea microvasculară între subtipurile hormonale de adenoame pituitare [295, 311].

În studiul autorilor din 2010 pe seria de 56 de adenoame pituitare [37] s-a găsit o corelație crescută între expresia de VEGF și CD31 pentru toate tipurile de adenoame pituitare, în special pentru prolactinoame și adenoame nefuncționale. Aceste rezultate vin în contradicție cu rezultatele publicate de Viacava et al, care a desemnat că densitatea microvasculară nu se corelează cu expresia de VEGF [311]. Această discrepanță ar putea fi explicată de diferențe în metodologie.

Autorii studiului [37] au evaluat 2 markeri de proliferare: Ki67, un antigen nuclear

exprimat în G1, G2 și faza de sinteză a ciclului celular dar nu în faza G0 [299] și PCNA, o proteină nucleară identificată ca o proteină auxiliară a enzimei DNA polimeraza delta, care se corelează bine cu proliferarea celulară [132]. și care a fost măsurată de către autori prin tehnica Western Blot. Nici unul din cei 2 markeri de proliferare nu s-a corelat în studiu cu markerii angiogenici CD31 și VEGF, rezultatele concordând cu ale altor autori [224, 245, 306, 309, 312, 317]. Deci VEGF ar contribui la un aport vascular tumoral adecvat prin mecanisme complexe, altele decât proliferarea celulară. Unele informații din literatură sugerează că VEGF ar putea prelungi supraviețuirea celulară prin inducerea expresiei unei proteine antiapoptotice bcl-2 în adenoamele pituitare. Deci activitatea angiogenică a VEGF este mediată parțial prin protecția celulelor endoteliale de apoptoză [225, 309].

S-a observat asocierea VEGF cu hemoragia intratumorală [5] și, de asemenea, se descrie un rol pentru VEGF în apariția peliozei, o formă de mimetism vasculogenic [86, 312]. Pelioza ar putea fi explicată prin funcția de permeabilizare a VEGF și de fenestrația crescută indusă în vasele sangvine stimulate prin supraexpresia VEGF. Pelioza poate fi observată în prolactinoame [211] și alte adenoame pituitare [330]. În studiul autorilor [37] expresia VEGF a fost similară la ambele sexe, nefiind influențată de vârstă sau ani de evoluție a adenoamelor hipofizare. Această observație este în concordanță cu majoritatea studiilor, care au arătat că sexul, vârsta sau rata de recurență sunt factori care nu au influențat expresia VEGF [165, 311]. S-au raportat rezultate contradictorii între MVD și vârsta sau sexul pacienților: Jugenburg [138, 147] nu a observat nici o corelație dar Turner et.al [307, 308] a evidențiat că MVD tumorală, în adenoamele somatotrofe, scade odată cu înaintarea în vârstă. Însă, într-un alt studiu, s-a observat o corelație pozitivă între vârstă și MVD [224, 238]. În seria celor 56 de adenoame hipofizare [296], autorii au observat că CD31 nu a fost diferit între sexe și nici nu s-a corelat cu vârsta pacienților. În ceea ce privește adenoamele nefuncționale, s-a observat o corelație pozitivă între CD31 și vârsta pacienților, așadar, conform acestor studii, vârsta ar influența gradul de neovascularizație al adenoamelor nefuncționale [183, 317].

În această ordine de idei, investigațiile efectuate înregistrează expresarea VEGF în adenoamele pituitare, în special în macroprolactinoame. Corelația pozitivă între expresia VEGF și CD31 în adenoamele hipofizare sugerează participarea vascularizației tumorale în dezvoltarea adenoamelor.

Ediția 2004 a clasificării histologice OMS a tumorilor endocrine a ilustrat doar 3 tipuri acceptate de leziuni adenohipofizare: adenoame pituitare tipice, adenoame pituitare atipice și carcinoame pituitare. Indexul de proliferare Ki67 este foarte util prin corelația sa cu invazivitatea

și probabil prognosticul tumorilor. Adenoamele pituitare cu index crescut (>3%) și imunoreactivitate p53 extensivă au fost considerate adenoame pituitare atipice, sugerând un potențial malign sau de transformare malignă. Diagnosticul de carcinoame pituitare se stabilește doar atunci, când există metastaze cerebro-spinale sau sistemice [82, 94, 118]. Al-Shraim și Asa au publicat o versiune a clasificării histologice WHO, cu referire la factori de transcripție și secreție hormonală [3]. Alți markeri valoroși în diagnosticul adenoamelor pituitare sunt: MMP (metaloproteinaze de matrice), topoisomeraza 2 - (Top)2 [134, 316], COX-2, expresia de VEGF și factori induși de hipoxie (HIF) [23, 229, 314, 316]. Împreună cu densitatea microvasculară și entropia structurală microvasculară [160, 313, 314]. Există un număr mare de liganzi ca: FGF-2, IGF-1, TGF- α , EGF, VEGF în micromediul celulelor pituitare normale și al celor adenomatoase, care interacționează cu receptori specifici și fac parte din clasa de protein-tirozin kinaze. Activarea acestor receptori, este indusă de ligand, prin autofosforilare rapidă, dar de scurtă durată, care ulterior este dezactivată prin intermediul fosfoprotein-fosfatazelor.

Unul din factorii de creștere care se leagă de EGFR este TGF- α , factor supraexprimat în adenoamele pituitare, pe când bFGF și TGF- α sunt exprimate în toate tipurile celulare și expresia lor este diminuată de TGF- β . Celulele învecinate în glanda pituitară, la fel ca celulele foliculostelate, creează un micromediu pentru pituicite, pentru secreția factorilor de creștere, în special EGF și citokine. Creșterea anormală a celulelor pituitare este mediată de mecanisme paracrine, în care un rol central îl are tandemul EGFR-PTTG. O terapie de perspectivă pentru adenoamele pituitare ar putea fi inhibiția expresiei de PTTG1, mediată de EGFR1 [312]. Substratul căii de semnalizare EGFR- Eps8 [319] este supraexprimat în adenoamele pituitare umane comparativ cu glanda pituitară normală. Calea de semnalizare declanșează proliferare crescută și mecanisme antiapoptotice în celulele pituitare prin activarea căii MAPK via ERK și a căii PI3K via AKT. Nivele crescute de proteine Eps8, AKt și ERK activate au fost găsite în special în gonadotrofinoame.

EGFR aparține familiei de receptori tirozin-kinazici, în care există 20 de forme înrudite funcțional dar diferite structural. Subfamilia EGFR este formată din 4 receptori înrudiți: EGFR (HER1 sau ErbB1), HER2 (sau ErbB2/neu), HER3 (ErbB3) și HER4 (ErbB4) [335]. Din punct de vedere structural, fiecare receptor este o glicoproteină transmembranară, formată dintr-un domeniu extracelular NH₂-terminal, o regiune transmembranară hidrofobă, un domeniu citoplasmatic care conține un domeniu tirozin-kinazic și o regiune carboxi-terminală cu activitate de tirozin-kinază intrinsecă [111]. Fixarea liganzilor specifici, așa ca EGF și TGF- α la EGFR determină dimerizarea receptorului și autofosforilarea domeniului intracelular [264, 281]. Există

2 căi implicate în semnalizarea EGFR: ras-raf-1-MAPK și PI3K-Akt. Fosforilarea MAPK determină activarea mai multor factori de transcripție: așa ca Elk-1, Sap-1, c-Myc și alții. Rolul căii Akt este de a inhiba unele proteine care induc apoptoza, cum ar fi Bcl-2 și caspaza-9. Prin urmare, prin activarea acestor căi se produce o semnalizare mitogenică, care generează mecanisme esențiale pentru progresia tumorală: proliferare celulară, inhibarea apoptozei, angiogeneza și invazia [254]. EGFR este exprimat de mai multe tipuri celulare, în special celulele epiteliale glandulare [54, 298]. Expresia EGFR este crescută în mai multe tumori epiteliale, astfel încât co-expresia nivelelor crescute de EGFR și liganzii săi generează un fenotip celular transformat [93]. Supraexpresia de EGFR, în majoritatea tumorilor, poate să nu fie asociată cu modificări detectabile în gena EGFR, dar există excepții cum ar fi gliomele sau carcinomul cu celule scuamoase, care prezintă amplificarea genei EGFR. În unele studii, expresia de EGFR a corelat cu markeri de agresivitate clinică [178, 273, 274]. Însă o meta-analiză recentă demonstrează că expresia de EGFR, dimpotrivă, rar corelează cu evoluția clinică [233]. Alt studiu ar fi înaintat ipoteza că fosforilarea de EGFR, și nu neapărat supraexpresia sa, ar fi asociată cu un prognostic prost [222]. Factorii de creștere polipeptidici, inductori ai proliferării celulare, sunt implicați în tumorigeneză [63, 119, 151] și ar putea avea un rol și în tumorigeneza pituitară [168]. Expresia de EGFR și liganzii săi specifici au fost examinați în adenoame pituitare cu rezultate foarte variabile [77]. Fosfo-EGFR[P-EGFR], forma activată de EGFR în adenoame pituitare și carcinoame a fost examinată de un grup de autori, [8] care au investigat expresia și starea de activare a EGFR în glanda pituitară normală, adenomul pituitar și carcinomul pituitar fiind investigate prin imunohistochimie (IHC) și hibridizare in situ (ISH), utilizând tehnica de microarray tisular (TMAs). RT-PCR a fost utilizat pentru analiza expresiei de EGFR-ARNm. Autorii au examinat expresia de EGFR în țesutul pituitar normal și în adenoamele pituitare prin IHC și ISH, utilizând tehnica de microarray tisular. Ambele metode au evidențiat expresia de EGFR în majoritatea adenoamelor hipofizare. În total 60% din adenoamele pituitare au fost de la moderat la intens pozitive pentru EGFR. Expresia de EGFR a fost mai mare în adenoamele pituitare non-funcționale (adenoame LH/FSH și adenoame cu celule nule) - 76% - față de adenoamele funcționale (GH, PRL, ACTH) - 34%. În grupul celor funcționale, adenoamele ACTH secretante au reprezentat cel mai mic procentaj de tumori care exprimă EGFR [227]. Constatarea expresiei mai intense a EGFR în adenoamele pituitare nefuncționale este similară cu cea din studiul altor autori LeRiche et al [172] și Chaidarun et al [40].

În studiul menționat, [40] expresia de P-EGFR, forma activată de EGFR, a fost considerabil mai scăzută în comparație cu EGFR. Autofosforilarea indusă de ligand a EGFR

implică dimerizarea sa [153]. Expresia concomitentă a EGFR și a liganzilor săi reprezintă un mecanism de stimulare autocrină a celulelor tumorale, determinând agresivitatea clinică a bolii [21].

Un studiu realizat de Birman et al [21] a arătat că locurile de legare ale EGF au existat în glanda pituitară normală dar nu în adenoamele pituitare funcționale sau cele non-funcționale. Studii mai recente au demonstrat însă expresia de EGF în adenoamele pituitare, utilizând IHC sau RT-PCR, rezultatele fiind foarte variabile [22, 44, 140, 172]. Într-un studiu a 46 de macroadenoame pituitare, s-au decelat locuri de legare al EGF cu expresie foarte variabilă: pozitivitatea pentru EGFR a fost observată în 55% din macroadenoame, mai ales prolactinoame (76%) și adenoame LH/FSH (62%) [343]. În studiul acesta autorii [152] au descris 2 clase de locuri de legare pentru EGF: cu afinitate crescută și cu afinitate scăzută.

Într-un studiu prezent, [150] primul, care evidențiază expresia de EGFR în carcinoame pituitare: 5 din cele 7 tumori studiate (2 carcinoame pituitare ACTH secretante, 2 secretante de prolactină și un carcinom pituitar LH/FSH) au arătat imunoreactivitate considerabilă pentru EGFR și P-EGFR. În acest studiu, [150, 172] carcinoamele pituitare au avut probabilitate mai mare de a supraexprima EGFR și P-EGFR comparativ cu adenoamele pituitare. Observația a fost mai pertinentă când au fost comparate adenoamele funcționale, în special cele GH- și ACTH-secretante, cu carcinoamele pentru expresia de P-EGFR. Aceste date sugerează un rol al EGFR în progresia adenoamelor pituitare.

Expresia de EGFR în celulele pituitare normale a fost descrisă în mai multe studii, [150, 154] unul dintre care, [80] relatează prezența nivelurilor scăzute de EGFR 5-10% din celulele pituitare. În unele studii [228, 300] expresia de EGFR, proteină P-EGFR și EGFR-ARNm a fost prezentă în glandele pituitare normale, variind în diferite tipuri celulare.

S-a formulat ipoteza că expresia crescută de EGFR poate fi un eveniment tardiv în tumorigeneza pituitară [228] și un marker de agresivitate într-un subset important de adenoame hipofizare [40, 141]. EGF este un mitogen pentru celulele pituitare și determină secreția de PRL și ACTH [226]. Receptorul comun pentru EGF și TGF- α , EGFR, este o tirozin-kinază transmembranară de 170 kDa, un produs al protooncogenei v-ErBB. În glanda pituitară, expresia de EGFR se corelează cu agresivitatea tumorală, în deosebi, în adenoamele pituitare GH-secretante [190]. Liganzii pentru familia de receptori EGFR includ: EGF, TGF- α , amfiregulină [AR], EGF cu legare de heparină (HB-EGF), betacellulină, epiregulină 9(ER), hereguline(HRG), neureguline (NR) [81].

Unele studii au examinat pituitarele pentru expresia liganzilor ErbB și au desemnat că

EGF s-a localizat în lobul anterior al pituitarei [33], și este prezent în toate stadiile de dezvoltare de la făt la adult, [33] fiind confirmat prin PCR, [21] IHC, [160] și western Blot (WB) în glandele pituitare prelevate la autopsie [85].

În glanda pituitară umană normală, TGF- α ARNm a fost detectat în toate tipurile de celule adenohipofizare, [25, 232] de asemenea, s-a demonstrat și expresia proteinei EGFR în toate tipurile celulare cu anticorpi direcționați împotriva domeniilor de receptori intra- și extracelulari [318].

Expresia proteinei EGFR a fost detectată și prin WB, EGFR ARNm prin RT-PCR în glandele pituitare normale și pozitivitate EGFR slabă prin IHC utilizând tehnica microarray [249]. Din adenoamele pituitare 64% exprimă ARNm-EGFR și/sau proteina sa: 66% din toate adenoamele pituitare nefuncționale și 62% din adenoamele funcționale, cu nivele de expresie mai crescute observate în tumori cu un fenotip mai agresiv [185, 249].

Receptorul ErbB2. S-a identificat imunocolorație pozitivă pentru ErbB2 prin utilizarea unui anticorp monoclonal orientat spre domeniul citoplasmatic al ErbB2 în celulele pituitare umane intacte [73, 218]. IHC cu un anticorp orientat spre domeniul intracelular al ErbB2 arată un pattern de colorație ErbB2 granular și citoplasmatic în doar câteva celule, deși ARNm este detectat în glandele pituitare normale. Expresia receptorului ErbB2 este prezentă în 31% din toate adenoamele pituitare, în 43% din adenoamele pituitare nefuncționale și în 24% din adenoamele pituitare funcționale. Colorația pozitivă citoplasmatică pentru ErbB2 a fost observată într-un număr variabil de celule în 40% din adenoamele pituitare invazive, în timp ce doar 1,2% din tumorile non-invazive au exprimat această proteină [190, 226].

Receptorul ErbB3. Expresia ErbB3 în glanda pituitară intactă nu a fost examinată. Cel de-al patrulea membru al familiei EGFR - ErbB4, este exprimat la nivele relativ înalte în glanda pituitară normală, lucru determinat prin RT-PCR; sursa celulară și funcția expresiei pituitare de ErbB4 nu sunt cunoscute. Liganzii pentru HER și EGFR au fost detectați în celule corticotrofe normale și în adenoamele pituitare corticotrofe. Într-un studiu, expresia EGF prin IHC a fost detectată în 38% din adenoamele pituitare corticotrofe, cu nivele mai mari de expresie în adenoamele invazive și în 2 din 2 carcinoame, în timp ce metastazele au prezentat un conținut mai crescut de EGF în comparație cu carcinomul [307]. Alte studii au raportat rate de expresie pentru EGF de până la 80% din adenoamele corticotrofe [315] și au detectat ARNm pentru EGF prin RT-PCR în 4/5 din adenoamele corticotrofe [76]. Expresia de EGFR în adenoamele corticotrofe a fost demonstrată în mod consistent, cu o rată de expresie de 75% din cele 77 de tumori corticotrofe analizate, prin IHC și ISH și anticorpi [28, 116, 215]. Utilizând un anticorp

care a țintit domeniul intracelular al EGFR în 102 adenoame pituitare, s-a decelat imunoreactivitate puternic pozitivă pentru EGFR în adenoamele corticotrofe, cu colorație mai slabă observată în alte adenoame pituitare funcționale și non-funcționale [30]. Adenoamele corticotrofe prezintă un număr semnificativ mai mare de celule imunoreactive pentru EGFR și o rată mai mare de fosfo-EGFR, forma activă a EGFR [30]. ErbB2 se localizează în celulele corticotrofe normale, dar nu este la fel de abundent ca și EGFR în adenoamele corticotrofe, 13% din tumori prezentând expresie pentru ErbB2 în diverse serii [116, 247, 330]. Expresia EGFR în adenoamele gonadotrofe este insuficient studiată la momentul actual. Într-o serie, 75% din 56 de adenoame non-funcționale au exprimat EGF fie prin IHC sau prin RT-PCR, cu rate variind de la 10-100% în diferite serii [76, 116, 182, 315].

În plus, ARNm pentru TGF- α și proteina sa sunt detectate în adenoame non-funcționale [194, 327]. Expresia de ARNm pentru EGFR și proteina sa au fost caracterizate în 379 de adenoame non-funcționale, cu o rată de pozitivitate totală de 66%, variind de la 0 la 100%, în funcție de tehnica utilizată [28, 30, 87, 116, 117, 315].

EGFR a fost decelat în macroadenoame gonadotrofe, cu rata de expresie mai mare în adenoame invazive, în special în cele care invadează sinusul sfenoid, [117] deci, EGFR ar putea fi un marker adițional de agresivitate pentru tumorile pituitare. Expresia ErbB2 în adenoamele pituitare non-funcționale a variat de la 0-100%, cu rate de pozitivitate de 43% în 174 cazuri de tumori analizate [116, 246, 330, 337]. Utilizând fie IHC sau RT-PCR, EGF a fost detectat în 50% din adenoamele GH-secretante, 74% din prolactinoame și 41% din adenoamele mixte GH/PRL [76, 116, 182, 224, 315]. Nivelul de invazie nu afectează nivelele de expresie de EGF în adenoamele bi- și plurihormonale de la pacienții cu acromegalie, deși expresia a fost mai crescută în adenoamele mixte GH/PRL non-invazive, comparativ cu adenoamele plurihormonale non-invazive [224]. Expresia TGF- α a fost confirmată prin IHC și RT-PCR în adenoamele GH și PRL secretante [298,310]. Peste jumătate din adenoamele GH, PRL și GH/PRL exprimă EGFR, lucru confirmat prin tehnici multiple, inclusiv IHC, RT-PCR și ISH [28, 30, 117, 315]. În plus față de detecția ErbB2 în celulele lactosomatotrofe normale, [116] IHC cu anticorpi care au țintit domenii intra- și extracelulare și RT-PCR, au confirmat expresia ErbB2 în 24% din adenoamele GH-secretante, 26% din adenoamele PRL-secretante și 32% din adenoamele mixte GH/PRL [37, 116, 183, 246, 330]. Într-un studiu, s-a efectuat colorație imunofluorescentă pentru ErbB2 pe 8 adenoame umane pituitare PRL-secretante, în 7 din cele 8 tumori analizate a fost observată colorația pozitivă cu intensități variabile pentru ErbB2 [37].

Pentru receptorul ErbB3 s-a decelat colorație pozitivă în 4 din cele 8 tumori pituitare PRL

secretante (3 adenoame și un carcinom) cu un index Ki-67 $\geq 4\%$. Expresia de ARNm pentru ErbB3 comparat prin analiză PCR cantitativă pe 2 eșantioane cu caracteristici progresiv agresive a demonstrat nivele de expresie a ARNm ErbB3 de 41 de ori mai crescute în eșantionul mai agresiv, atribuind ErbB3 rolul de transformare malignă a prolactinoamelor pituitare [37].

Analiza surselor bibliografice permite formularea scopului și obiectivelor cercetării realizate: **Scopul lucrării:** Studiul a factorilor moleculari cu rol predictiv și terapeutic abordați dependent de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Caracteristica histopatologică, imunohistochimică și moleculară a adenoamelor hipofizare din Republica Moldova pentru identificarea unor noi factori de prognostic și a unor noi ținte terapeutice personalizate. **Obiectivele lucrării:** Evaluarea spectrului histopatologic al adenoamelor hipofizare din zona Republicii Moldova; Realizarea profilului hormonal al adenoamelor hipofizare prin utilizarea imunohistochimiei pentru GH, prolactină, TSH, ACTH, FSH, LH; Studiul concordanței diagnostice dintre aspectele imunohistochimice și histopatologie; Identificarea rolului factorilor de creștere în patogeneza adenoamelor hipofizare; Influența profilului hormonal asupra ratei de proliferare a adenoamelor hipofizare; Studiul proteinei HER2 și a EGFR în raport cu profilul hormonal al adenoamelor hipofizare incluse în studiu; Rolul proteinei S100 și a GFAP în prognosticul adenoamelor hipofizare; Rolul hibridizării in situ în îmbunătățirea diagnosticului molecular al adenoamelor hipofizare; Stabilirea unui protocol de evaluare diagnostică a adenoamelor hipofizare care să includă parametrii histopatologici, imunohistochimici și moleculari cu potențial impact prognostic și terapeutic.

1.5. Concluzii la capitolul 1

1. Adenoamele hipofizare reprezintă un spectru larg de tulburări care pot fi analizate și clasificate în funcție de secreția hormonală.
2. O buna parte din aceste tumori sunt “ silențioase”, subclinice, nefiind operate niciodată de neurochirurg, este foarte important sa diferențiem incidentaloamele.
3. Caracterizarea moleculară a adenoamelor hipofizare, extrem de necesară pentru identificarea factorilor cu posibil impact prognostic și terapeutic este extrem de puțin studiată.
4. Tipurile de adenoame hipofizare pure, par să aibă un profil imunohistochimic aparte in Republica Moldova.

2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Obiectul de studiu

Adenoamele hipofizare reprezintă o patologie aparte a tumorilor de la nivelul cutiei craniene. Heterogenitatea celulară ce caracterizează hipofiza normală îngreunează diagnosticul corect al tumorilor hipofizare bazat doar pe aspectele histopatologice utilizând colorațiile uzuale. Profilul hormonal al adenoamelor hipofizare reprezintă, momentan, “standardul de aur” al diagnosticului adenoamelor hipofizare pe care se bazează tratamentul medicamentos al adenoamelor hipofizare asociat terapiei chirurgicale.

Un număr relativ crescut de adenoame hipofizare tratate chirurgical și/sau medicamentos recidivează. Cea mai frecventă cauză a recidivelor este considerată în prezent ca fiind o îndepărtare chirurgicală incompletă a tumorii și, într-o mica măsură include alți factori de prognostic cum ar fi de exemplu tipul histopatologic și molecular sau rata de proliferare a adenoamelor hipofizare. Dintre factorii recurenți favorizanți ai adenoamelor hipofizare, aspectul plurihormonal evidențiat imunohistochimic, în special în cazul macroadenoamelor non funcționale sau, expresia altor hormoni decât cei de tip gonadotrofinic, par să reprezinte factori de prognostic nefavorabil în evoluția și recurențele acestor tumori [26]. De asemenea, absența radioterapiei postoperatorii sau prezența invaziei sinusului cavernos sunt considerați factori de risc independenți pentru recurențele întâlnite în adenoamele hipofizare.

Așa cum rezultă din aspectele prezentate atât în partea generală a acestei teze cât și din datele descrise mai sus, majoritatea factorilor de prognostic sunt clinici sau evolutivi, factorii celulari moleculari fiind neglijați, deoarece sunt foarte puțin studiați. Rata de proliferare a adenoamelor hipofizare este doar sporadic studiată, acest aspect fiind derivat din faptul că, prin definiție, adenoamele hipofizare sunt considerate ca fiind tumori cu o creștere lentă în majoritatea cazurilor. Articole recente, dar sporadice din literatură sugerează că vârsta, sexul, profilul hormonal imunohistochimic și prezența invaziei în momentul diagnosticului reprezintă factori cu rol prognostic, dar fără o implicare terapeutică concretă.

În prezent nu există factori prognostici sau cu impact terapeutic de evaluare a adenoamelor hipofizare. Receptorii factorilor de creștere de tipul HER2 sau EGFR sunt puțin studiați în patologia adenoamelor hipofizare [344], cele mai multe studii fiind realizate pe model experimental murin [128, 320]. Din acest motiv, aceste ținte terapeutice recunoscute ca fiind extrem de utile în terapia specifică a altor tipuri de tumori [290] sunt departe de a fi complet elucidate în patologia adenoamelor hipofizare și, cu atât mai puțin de a fi utilizate ca ținte

potențiale pentru tratamentul adenoamelor hipofizare primare, și /sau recidivate sau invazive. Factorii de creștere de tipul factorului de creștere al endoteliului vascular (VEGF), factorilor de creștere derivați din plachete (PDGFs) sau a factorului de creștere fibroblastic (FGF2) au fost studiați în adenoamele hipofizare ca inductori ai angiogenezei tumorale [90, 107, 164, 194, 252] și, într-o mică măsură ca posibili factori prognostici și terapeutici de sine stătători cu rol în transformarea malignă și invazie.

Factorii prognostici și terapeutici în adenoamele hipofizare sunt incomplet elucidați. Din acest motiv, prezenta teză de abilitare și-a propus studiul mai multor factori care ar putea avea un potențial rol prognostic și terapeutic în patogeneza adenoamelor hipofizare. Aceștia au constituit principalele obiective ale prezentei lucrări, obiective enumerate mai jos.

Situația descrisă mai sus, se referă la stadiul actual al diagnosticului și terapiei adenoamelor hipofizare la nivel european și mondial. În Republica Moldova, adenoamele hipofizare sunt frecvent diagnosticate pe baza datelor clinice și imagistice performante, dar diagnosticul microscopic se rezumă doar la descrierea clasică histopatologică, bazată pe morfologia și tinctorialitatea a celulelor ce intră în componența adenoamelor hipofizare. Studiul adenoamelor hipofizare din punct de vedere imunohistochimic este limitat și, mai mult, aspectele moleculare care ar putea avea un rol prognostic și terapeutic lipsesc cu desăvârșire [192]. Evaluarea incompletă a adenoamelor hipofizare atrage după sine aplicarea terapiei în mod aleatoriu, cea mai frecventă terapie aplicată fiind cea chirurgicală și în mică măsură cea medicamentoasă. Din acest motiv, rata recidivelor adenoamelor hipofizare rămâne la un nivel ridicat iar prognosticul și evoluția pe termen lung sunt considerate încă nefavorabile. Metodele imunohistochimice și moleculare care ar putea îmbunătăți terapia și prognosticul pe termen lung al pacienților cu adenoame hipofizare.

2.2. Caracteristica generală a cercetării

Selecția cazurilor și procesarea primară. Pentru studiul de față am investigat 96 de cazuri (10 hipofize normale, obținute în timpul necropsiilor și 86 de cazuri diagnosticate cu adenom hipofizar, aflate în diferite stadii de evoluție clinică). Pacienții au fost internați la Centrul Științifico-Practic de Neurologie și Neurochirurgie al Spitalului Clinic Republican. Pacienții au fost investigați din punct de vedere clinic și imagistic, tumorile hipofizare fiind certificate prin examen computer tomografic și investigații de rezonanță magnetică nucleară. Tratamentul chirurgical al tumorii s-a realizat prin abord intranasal sau transsfenoidal. Consimțământul informat a fost obținut de la toți indivizii incluși în acest studiu înainte de începerea procedurilor medicale.

Biopsiile obținute au fost spălate în ser fiziologic, fixate în formalină tamponată la pH7.2 timp de 48-72 de ore, și incluzionate în parafină, după tehnica histologică uzuală, folosind sistemul automatizat și standardizat Thermo Shandon. Procesarea țesuturilor s-a efectuat prin deshidratare cu ajutorul soluțiilor de alcool, clarifiere în benzen și incluzionare în parafină. Pentru a minimaliza denaturarea antigenilor, țesuturile nu s-au expus la temperaturi mai mari de 60°C în cursul incluzionării în parafină. S-a efectuat apoi secționare seriată la microtom (Shandon ME) (15 secțiuni/bloc, cu grosimea de 3 microni) pentru diagnosticul primar. Secțiunile au fost montate pe lame silanate plasate la termostat la 60°C timp de 60 de minute, apoi la 37°C timp de 24 de ore, pentru a asigura adeziunea secțiunilor la lame.

Cu excepția metodei de *hibridizare in situ*, pentru toate celelalte metode, procedura propriu zisă a fost precedată de deparafinarea și rehidratarea secțiunilor la parafină. Deparafinarea la termostat, la 58°C, timp de 60 minute a fost urmată de plasarea lamelor în două băi succesive de benzen a câte 5 minute fiecare; au urmat apoi băi succesive de etanol în concentrații descrescătoare 100%, 95%, 80%, 75%, a câte 5 minute; spălare cu apă distilată.

Selecția și procesarea primară pentru studiul comparativ a cazurilor din România și Republica Moldova. Un număr total de 180 de cazuri au fost sistematizate în două grupuri distincte. Primul grup denumit „B” a inclus 94 de cazuri de adenoame hipofizare selectate de Departamentul de endocrinologie al Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila” București, România, în timp ce al doilea grup denumit „C” a fost format din 86 de cazuri de adenoame hipofizare selectate de departamentul de morfopatologie al USMF „Nicolae Testemițanu” Chișinău, R. Moldova. Cele mai multe cazuri incluse în grupul „B” au fost colectate din partea de sud și est a României, în timp ce cazurile din grupul „C” au provenit din toate regiunile Republicii Moldova.

Pentru a obține cea mai bună estimare posibilă a veridicității prevalenței adenoamelor hipofizare la populația generală, am efectuat o revizuire sistematică a articolelor publicate, studii imagistice și metode histologice. Pentru a depăși variația între studii, am folosit efecte aleatorii pentru a estima prevalența populației utilizând un algoritm de ponderare inversă în care greutatea sunt estimate din variația studiului.

Materialul biopsic a fost recoltat prin intervenție chirurgicală deschisă sau abord transfenoidal. Fiecare caz a fost diagnosticat pe baza datelor clinice, biologice și imagistice. Biopsiile au fost fixate în formalină tamponată 10% pentru 48 ore și apoi incluse la parafină conform protocolului standardizat. Secțiuni seriate de 3 microni au fost obținute din fiecare bloc de parafină. Evaluarea histopatologică s-a realizat pe lamele colorate hematoxină/eozină. Pe baza evaluării morfologice au fost selectate câte 6 secțiuni adiționale pe care s-a realizat profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Prin intermediul metodei imunohistochemice s-a realizat studiul celor 6 tipuri de hormoni (GH, PRL, ACTH, TSH, FSH, LH). Detalii despre anticorpii utilizați și despre procedura imunohistochemică se regăsesc în tabelul 1. Întreaga procedură imunohistochemică s-a realizat în sistem automat, folosind sistemul de imunohistochemie Bond (Leica Microsystems). Evaluarea microscopică a fost efectuată de trei observatori independenți utilizând microscopul Nikon Eclipse E600 (Nikon Corporation Japan). Imaginile au fost capturate și procesate folosind sistemul Lucia G. Prezența unui procent de peste 10% la sută de celule pozitive a fost considerată ca tumoare secretorie. Rezultatele imunohistochemice pentru fiecare caz au fost gradate ca 0, 1, 2 și 3. Tumorile cu o expresie crescută GH, PRL au fost considerate mamosomatotrofe. Analiza statistică s-a realizat folosind sistemul SPSS versiunea 17. Metodele statistice au inclus teste de corelație ca: Pearson, Kendall și Spearman. Corelațiile au fost considerate semnificativ statistice dacă au avut o valoare a lui p mai mic de 0,05. O corelație a fost considerată totală, atunci când toate cele trei tipuri de teste au prezentat valori semnificative; și parțială, dacă două din cele trei teste de corelație au prezentat semnificație statistică.

2.3. Metode de cercetare

Metoda morfologică a fost constituită din colorarea lamelor cu *hematoxină-eozină*: lamele au fost imersionate în hematoxină Harris pentru 3 minute; s-au spălat cu apă curentă 5 minute pentru a obține diferențierea; spălare cu apă distilată 5 minute; imersionare în eozină 30 secunde; spălare cu apă distilată 5 minute; pentru deshidratare s-au introdus lamele în două băi succesive de etanol 100%; uscare la aer; s-au introdus apoi în benzen 10 minute pentru clarifiere; montare cu balsam de Canada.

Pe baza colorației morfologice, s-a stabilit diagnosticul histopatologic de adenom hipofizar conform clasificării WHO. De asemenea s-a realizat selecția cazurilor pentru care s-au aplica ulterior metodele imunohistochimice și moleculare utilizate în continuare.

Metodele imunohistochimice permit vizualizarea antigenelor proteice tisulare sau celulare. Se bazează pe imunoreactivitatea anticorpilor și proprietățile chimice ale enzimelor sau complexelor enzimatică care reacționează cu substraturi cromogenice necolorate, pentru a produce compuși finali colorați. Principiul procedurii include mai mulți pași care urmează deparafinarea și rehidratarea secțiunilor. Demascarea antigenului a necesitat soluție de EDTA la pH 9 și încălzirea lamelor timp de 15 minute. După răcirea la temperatura camerei s-a aplicat blocarea peroxidazei endogene cu soluție de apă oxigenată 3% în apă distilată timp de 5 minute. Incubarea cu anticorpul primar s-a realizat timp de 30 de minute la temperatura camerei.

Profilul hormonal complet a inclus identificarea imunohistochimică a șase tipuri de hormoni hipofizari. În acest studiu a fost investigată expresia imunohistochimică a următorilor hormoni: prolactina, somatotrop, ACTH, TSH și a gonadotropilor (FSH, LH). S-au utilizat următoarele metode imunohistochimice, pentru fiecare hormon în parte:

- GH - S-au utilizat anticorpi anti- GH (DakoCytomation, diluție 1: 400). După incubarea timp de 30 minute cu anticorpul primar, a fost aplicat sistemul de lucru Novolink Max Polymer (Leica Microsystems). Pentru vizualizare s-a folosit cromogenul 3,3 diaminobenzidina, iar contracolorarea s-a efectuat cu hematoxină Lillie modificată.
- PRL - S-au utilizat anticorpi anti- PRL (DakoCytomation, diluție 1: 250). După incubarea timp de 30 minute cu anticorpul primar, a fost aplicat sistemul de lucru Novolink Max Polymer (Leica Microsystems). Pentru vizualizare s-a folosit cromogenul 3,3 diaminobenzidina, iar contracolorarea s-a efectuat cu hematoxină Lillie modificată.

- TSH - S-au utilizat anticorpi anti- TSH (DakoCytomation, clona 0042, diluție 1: 50). După incubarea timp de 30 minute cu anticorpul primar, a fost aplicat sistemul de lucru Novolink Max Polymer (Leica Microsystems). Pentru vizualizare s-a folosit cromogenul 3, 3 diaminobenzidina, iar contracolorarea s-a efectuat cu hematoxilină Lillie modificată.
- FSH - S-au utilizat anticorpi anti- FSH (DakoCytomation, clona C10, diluție 1: 50). După incubarea timp de 30 minute cu anticorpul primar, a fost aplicat sistemul de lucru Novolink Max Polymer (Leica Microsystems). Pentru vizualizare s-a folosit cromogenul 3, 3 diaminobenzidina, iar contracolorarea s-a efectuat cu hematoxilină Lillie modificată.
- LH - S-au utilizat anticorpi anti- LH (DakoCytomation, clona C93, diluție 1: 50). După incubarea timp de 30 minute cu anticorpul primar, a fost aplicat sistemul de lucru Novolink Max Polymer (Leica Microsystems). Pentru vizualizare s-a folosit cromogenul 3, 3 diaminobenzidina, iar contracolorarea s-a efectuat cu hematoxilină Lillie modificată.
- ACTH - S-au utilizat anticorpi anti- ACTH (DakoCytomation, clona C93, diluție 1: 50). După incubarea timp de 30 minute cu anticorpul primar, a fost aplicat sistemul de lucru Novolink Max Polymer (Leica Microsystems). Pentru vizualizare s-a folosit cromogenul 3, 3 diaminobenzidina, iar contracolorarea s-a efectuat cu hematoxilină Lillie modificată.

Pentru punerea în evidență a indexului de proliferare Ki67 s-a folosit tehnica imunohistochimică cu anticorpi direcți împotriva MIB-1. Imunohistochimia pentru identificarea expresiei proteinei HER2 a utilizat sistemul automat de detecție ORACLE de la Leica, sistem complet standardizat. Același protocol standardizat s-a aplicat și pentru EGFR, VEGF, clona VG1, diluție 1:25 a provenit de la Reliatech (Germania), la fel ca și FGF2, podoplanina, clona D2-40. PDGF A și PDGF B au fost achiziționați de la Santa Cruz Biotechnology (USA).

Hibridizare in situ pentru identificarea RNA și DNA pe secțiuni la parafină. *Metoda RNA scope* a evaluat conținutul celular în RNA sub forma vizualizării unei singure molecule în celule individuale pe speciemenle fixate în formalină și incluse la parafină (FFPE) prin utilizarea unei noi strategii de design a probei și printr-un sistem de amplificare a semnalului bazat pe hibridizare în vederea amplificării simultane a semnalelor și suprimarea terenului. HRP-ul conjugat cu probele dublu Z pentru VEGF, complementar pentru țintirea RNA au fost realizate

de către Advanced Cell Diagnostics (Hayward, CA). Am utilizat kitul RNA scope High Definition (Advanced Cell diagnostics, Hayward, CA) pentru amplificarea semnalului urmat de vizualizarea semnalelor amplificate cu diaminobenzidină drept cromogen.

Pe scurt, în vederea preparării specimenelor FFPE pentru procedura RNA scope, țesuturile au fost fixate și permeabilizate pentru a permite accesul probei țintă. S-a realizat o etapă de hibridizare de 2 ore la 40° C urmată de amplificarea multistep a semnalului efectuată prin aplicarea reactivilor urmată de vizualizarea RNA sub formă de puncte brune colorate cu diaminobenzidină. Protocolul de lucru a fost similar cu cele descrise de către Wang et al [324]. Detecția sensibilității metodei RNA scope a fost certificată prin utilizarea controalelor pozitive (POLR2A) și negative (probe orientate împotriva genei bacteriene *dapB*) evaluate în baza aceluiași protocol ca și pentru speciemenle de pterigium.

Interpretarea amplificării VEGF mRNA s-a efectuat manual în manieră semicantitativă urmărind ghidurile de scor oferite de producător. Prezența amplificării m RNA VEGF a fost clasificată în cinci grade ca 0 (nici o colorație sau mai puțin de 1 punct pentru fiecare 10 celule, mărire x40), 1 (1-3 puncte/celulă vizibile la mărirea 20-x40), 2 (4-10 puncte/celulă, foarte puține clustere de puncte vizibile la mărirea 20-x40), 3 (>10 puncte/celulă, mai puțin de 10% celule pozitive cu clustere de puncte vizibile la mărirea x20) și 4 (> 10 puncte /celulă, mai mult de 10% celule pozitive cu clustere de puncte vizibile la mărirea x20).

În cazul evaluării proteinei HER2, pentru cazurile selectate s-a aplicat metoda de hibridizare in situ cu cromogen (CISH), folosind trusa specială standardizată produsă de Invitrogen.

Examinarea și analiza imaginilor microscopice. Examinarea s-a efectuat cu ajutorul microscopului optic Nikon Eclipse600, imaginile fiind preluate cu ajutorul camerei digitale Coolpix950. Analiza imaginii microscopice s-a efectuat cu programul LuciaNet (Nikon), pe imagini obținute JPEG, la calibrare x400. Analiza imaginii s-a efectuat după metoda hot-spot, alegându-se câmpurile microscopice cu densitate maximă a semnalelor pozitive.

Evaluarea imun-reactivității hormonilor hipofizari a fost făcută astfel: densitate sub 5%=0, între 5-10%= +1, între 10-50%= +2, valori între 50-100% = +3; de asemenea s-a evaluat și intensitatea reacției; 0 – (+1) adenoame nesecretante; +2 - +3 adenoame secretante.

Evaluarea indicelui de proliferare Ki67 s-a efectuat cu ajutorul unui microscop Nikon Eclipse E600, la o mărire de 400X, asistat de un program computerizat specializat de numărarea celulelor (NSI). S-au evaluat zonele cu cea mai mare imunoreactivitate, fiind evaluate în medie 1000 de celule per caz (aproximativ 3 câmpuri microscopice preluate ca imagini multimedia).

Pentru aprecierea reacției pozitive a factorilor de creștere investigați, am aplicat un scor bazat pe incidența celulelor pozitive asociat cu intensitatea produsului final de reacție. La cazurile pozitive scorul a fost cuprins între 2 și 6. Scorul utilizat în aceste condiții (evaluarea expresiei VEGF și PDGF) este redat în Tabelul 2.1..

Tab. 2.1. Scorul de evaluare a expresiei factorilor de creștere

Parametru	Intensitate	Incidență
Slabă	+1	<10%, +1
Moderată	+2	10-50%, +2
Intensă	+3	>50%, +3

2.4. Analiza statistică

Procesarea matematico-statistică a rezultatelor studiului

Datele obținute au fost procesate computerizat prin metode de analiză variațională, cu aplicarea sistemului de operare „Microsoft Windows 10” a pachetului integrat de birotică „Microsoft Office 2007” cu procesorul de tabele EXCEL.

Veridicitatea datelor statistice obținute în prezentul studiu științific a fost stabilită prin determinarea testului de semnificație **t** – Student și pragului de semnificație – **p**.

Indicatorii statistici ai prezentului studiu științific au fost calculați în baza următoarelor formule:

- *media aritmetică simplă*

$$X_{as} = \frac{\sum_{i=1}^n \chi}{n} \quad (2.1)$$

unde:

X_{as} – media aritmetică simplă

χ – valoarea fiecărei variabile

Σ – simbolul sumei

n – numărul total de variabile

- *proporția* a fost calculată în procente (%) după următoarea formulă:

$$Pr = \frac{X}{X+Y} \times 100 \quad (2.2)$$

unde:

Pr – proporție

X – indicatorul studiat

X+Y – totalitatea de origine a indicatorului studiat (X)

Analiza statistică s-a realizat folosind software-ul SPSS, versiunea 13. Metodele statistice au inclus trei teste de corelație (testele Spearman, Kendall, și Pearson). O corelație semnificativă a fost luată în considerare pentru o valoare a $p < 0.05$.

Corelație (Pearson, Kendall, Spearman)

Corelația este o analiză bivariată care măsoară forța asocierii între două variabile și direcția relației. În ceea ce privește forța relației, valoarea coeficientului de corelație variază între

+1 și -1. O valoare de ± 1 indică un grad perfect de asociere între cele două variabile. Deoarece valoarea coeficientului de corelație se îndreaptă spre 0, relația dintre cele două variabile va fi mai slabă. Direcția relației este indicată de semnul coeficientului; Semnul a + indică o relație pozitivă, iar semnul a - indică o relație negativă. De obicei, în statistici, se măsoară patru tipuri de corelații: corelația Pearson, corelația rangului Kendall, corelația Spearman și corelația Point-Biserial. Software-ul permite să efectuăm foarte ușor o corelație.

Coeficient de corelație Pearson

Corelația Pearson r este cea mai răspândită statistică de corelare pentru măsurarea gradului de relație între variabilele liniare. Corelația punct-biserială se realizează cu formula de corelare Pearson, cu excepția faptului că una dintre variabile este dihotomă. Următoarea formulă este utilizată pentru a calcula corelația Pearson: În statistică, coeficientul de corelație Pearson (PCC, pronunțat / piərsən /), denumit și Pearson's r , coeficientul de corelație a produsului-moment Pearson (PPMCC) sau corelația bivariată dintre două variabile X și Y . Are o valoare între +1 și -1, unde 1 este corelația liniară totală pozitivă, 0 nu este o corelație liniară și -1 este corelația liniară totală negativă.

Coeficientul de corelare Pearson este covarianța celor două variabile împărțite de produsul abaterilor standard. Forma definiției implică un "moment de produs", adică media (primul moment despre originea) produsului variabilelor aleatorii ajustate în medie; prin urmare, produsul-moment al modificatorului.

Coeficientul de corelare Pearson atunci când este aplicat unei populații este în mod obișnuit reprezentat de litera greacă ρ (rho) și poate fi denumit coeficientul de corelație a populației sau coeficientul de corelație Pearson al populației. Formula pentru ρ este:

$$r_{xy} = \frac{N \sum_{i=1}^N X_i Y_i - \sum_{i=1}^N X_i \sum_{i=1}^N Y_i}{\sqrt{\left[N \sum_{i=1}^N X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N X_i \right)^2 \right] \left[N \sum_{i=1}^N Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N Y_i \right)^2 \right]}} \quad (2.3)$$

Unde:

r = coeficient de corelație Pearson

N = numărul de observații

S_{xy} = suma produselor scorurilor asociate

Σx = suma scorurilor x

Σy = suma scorurilor y

Σx^2 = suma scorurilor x pătrat

Σy^2 = suma scorurilor de la pătratul y

Valorile absolute ale coeficienților de corelație Pearson și ale populației sunt mai mici sau egali cu 1. Corelațiile egale cu 1 sau -1 corespund fazelor liniare (în cazul corelării eșantioanelor) sau la un bivariat distribuție sprijinită în întregime pe o linie (în cazul corelației populației). Coeficientul de corelație Pearson este simetric: $\text{corr}(X, Y) = \text{corr}(Y, X)$.

O proprietate matematică cheie a coeficientului de corelație Pearson este caracterul invariabil în urma schimbărilor separate în locație și scală în cele două variabile. Adică, putem transforma X în $a + bX$ și transforma Y în $c + dY$, unde a, b, c și d sunt constante cu $b, d > 0$, fără a schimba coeficientul de corelație.

Coeficientul de corelație variază de la -1 la 1. O valoare de 1 implică faptul că o ecuație liniară descrie perfect relația dintre X și Y, toate datele fiind situate pe o linie pentru care Y crește cu creșterea X. O valoare de -1 implică faptul că toate datele se află pe o linie pentru care Y scade cu creșterea lui X. O valoare de 0 implică faptul că nu există o corelație liniară între variabile.

În general $(X_i - X)(Y_i - Y)$ este pozitiv dacă și numai dacă X_i și Y_i se află pe aceeași parte a metodologiei respective. Astfel, coeficientul de corelație este pozitiv dacă X_i și Y_i tind să fie simultan mai mari decât sau simultan mai puțin decât mijloacele lor respective. Coeficientul de corelație este negativ (anti-corelație) dacă X_i și Y_i se află pe laturile opuse ale mijloacelor lor respective. Mai mult, cu cât mai puternică este fie tendința, cu atât este mai mare valoarea absolută a coeficientului de corelare.

Inferența statistică bazată pe coeficientul de corelație al lui Pearson se concentrează deseori pe unul din următoarele două obiective:

Un obiectiv este de a testa ipoteza nulă că adevăratul coeficient de corelație ρ este egal cu 0, pe baza valorii coeficientului de corelație a eșantionului r.

Celălalt scop este obținerea unui interval de încredere care, la eșantionarea repetată, are o probabilitate dată de a conține ρ .

Coeficientul de corelație Kendall

Corelația gradului Kendall este un test neparametric care măsoară forța dependenței dintre două variabile. Dacă luăm în considerare două eșantioane a și b, unde fiecare eșantion este egal cu n, știm că numărul total de asociere cu b este $n(n-1)/2$

În statistici, coeficientul de corelare Kendall, denumit în mod obișnuit coeficientul tau

Kendall (după litera greacă τ), este o statistică folosită pentru a măsura asocierea ordinală între două cantități măsurate. Un test tau este un test ipotetic nonparametric pentru dependența statistică pe baza coeficientului tau.

Corelația Kendall între două variabile va fi crescută atunci când observațiile au un indice similar (sau identic pentru o corelație de 1) (adică apreciere pozitivă relativă a observațiilor din cadrul variabilei: 1, 2, 3, etc.) între cele două variabile și scăzute atunci când observațiile au indici diferiți (sau complet diferită pentru o corelație de -1) între cele două variabile.

Următoarea formulă este utilizată pentru a calcula valoarea corelației rangului Kendall:

$$\tau = \frac{n_c - n_d}{\frac{1}{2}n(n-1)} \quad (2.4)$$

unde:

- n_c = numărul de concordante
- n_d = Numărul de discordante

- Numitorul este numărul total de combinații de perechi, deci coeficientul trebuie să fie în intervalul $-1 \leq \tau \leq 1$.
- Dacă acordul dintre cele două mulțimi este perfect (adică cele două clasamente sunt identice) coeficientul are valoarea 1.
- Dacă dezacordul dintre cele două mulțimi este perfect (adică, o clasare este inversă a celeilalte) coeficientul are valoarea -1.
- Dacă X și Y sunt independente, atunci ne așteptăm ca coeficientul să fie aproximativ zero.

Coeficientul de corelare Spearman

Coeficientul de corelare Spearman sau rho Spearman, numit după Charles Spearman și adesea denotat de litera greacă ρ , este o măsură non parametrică a corelației dependenței statistice a două variabile. Evaluează cât de bine poate fi descrisă relația dintre două variabile utilizând o funcția monotonă.

Corelația Spearman între două variabile este egală cu corelația Pearson între valorile rangului celor două variabile; în timp ce corelația lui Pearson evaluează relațiile liniare, corelația lui Spearman evaluează relațiile monotone (liniare sau nu). Dacă nu există valori repetate ale datelor, o corelație perfectă Spearman de +1 sau -1 are loc atunci când fiecare dintre variabile este o funcție monotonă perfectă a celeilalte.

Intuitiv, corelația Spearman dintre două variabile va fi ridicată atunci când observațiile au

un grad similar (sau identic pentru o corelație de 1) (adică eticheta pozitivă relativă a observațiilor din cadrul variabilei: 1, 2, 3, etc.) între cele două variabile și scăzute atunci când observațiile au o diferență (sau se opune în totalitate pentru o corelație de -1) între cele două variabile.

Coeficientul Spearman este adecvat atât pentru variabilele ordinale continue, cât și pentru cele discrete. Atât Spearman cât și lui Kendall pot fi formulate ca cazuri speciale ale unui coeficient de corelare mai general.

Rata de corelație Spearman este un test non-parametric care este utilizat pentru a măsura gradul de asociere între două variabile. Testul de corelare Spearman nu are nicio ipoteză cu privire la distribuirea datelor și este analiza de corelare adecvată atunci când variabilele sunt măsurate pe o scală care este cel puțin ordonată.

Următoarea formulă este utilizată pentru a calcula corelația rangului Spearman:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n d_i^2}{n^3 - n} \quad (2.5)$$

Unde

ρ = Corelația gradului Spearman

d_i = diferența dintre șirurile variabilelor corespunzătoare

n = numărul de observații

Demonstrația corelării Spearman indică direcția de asociere dintre X (variabila independentă) și Y (variabila dependentă). Dacă Y tinde să crească atunci când X crește, coeficientul de corelație Spearman este pozitiv. Dacă Y tinde să scadă când crește X, coeficientul de corelație Spearman este negativ. O corelație Spearman de zero indică faptul că nu există nici o tendință ca Y să crească sau să scadă când X crește. Corelația Spearman crește în magnitudine, pe măsură ce X și Y devin mai aproape de a fi funcții monotone perfecte una față de cealaltă. Atunci când X și Y sunt corelate perfect monotonic, coeficientul de corelație Spearman devine 1. O relație de creștere perfect monotonă implică faptul că pentru oricare două perechi de valori de date X_i, Y_i și X_j, Y_j , $X_i - X_j$ și $Y_i - Y_j$ au întotdeauna același semn. O relație de scădere monotonă perfectă denotă faptul că aceste diferențe au întotdeauna semne opuse. O corelație perfectă Spearman rezultă atunci când X și Y sunt legate de orice funcție monotonă. Contrastează acest lucru cu corelația Pearson, care oferă o valoare perfectă doar atunci când X și Y sunt legate de o funcție liniară. Celălalt sens în care corelația Spearman este neparametrică prin aceea că

distribuția exactă a eșantionului poate fi obținută fără a necesita cunoașterea (adică cunoașterea parametrilor) a distribuției de probabilitate comună a lui X și Y.

Analiza varianței (ANOVA)

Variația ANOVA este o colecție de modele statistice și procedurile asociate acestora (cum ar fi "variația" între grupuri) folosite pentru a analiza diferențele dintre grupuri. ANOVA este utilă pentru compararea (testarea) a trei sau mai multe mijloace (grupuri sau variabile) pentru semnificația statistică. Este conceptual similar cu testele multiple cu două probe, dar este mai conservator (duce la o eroare mai mică de tip I) și, prin urmare, este potrivit pentru o gamă largă de probleme practice.

ANOVA este utilizat în analiza experimentelor comparative, în care numai interesul diferă doar în rezultate. Semnificația statistică a experimentului este determinată de un raport de două variante. Acest raport este independent de câteva modificări posibile ale observațiilor experimentale: adăugarea unei constante la toate observațiile nu-i alterează semnificația. Multiplicarea tuturor observațiilor printr-o constantă nu modifică semnificația. Astfel, rezultatul statistic al ANOVA este independent de erorile constante de bias și de scalare, precum și de unitățile utilizate în exprimarea observațiilor. Acesta este un exemplu de codificare a datelor.

2.5. Concluzii la capitolul 2

1. Profilul hormonal complet a inclus identificarea imunohistochimică a șase tipuri de hormoni hipofizari, care au fost identificați în adenoame pure și combinate pentru a alege metoda de tratament personalizat în fiecare caz particular.
2. Punerea în evidență a indicelui proliferare Ki67 prin tehnica imunohistochimică cu anticorpi direcți împotriva MIB-1 a permis determinarea creșterii tumorale și respectiv prognosticul în fiecare caz în parte.
3. Studiul integral a cuprins diferite eșantioane selectate pe bază de profilul molecular și paternul de creștere a adenoamelor hipofizare pure și combinate fiind selectate în baza colorației standard cu hematoxilin-eosină.
4. Eșantioanele au fost studiate prin următoarele metode de cercetare: matematică, serie cronologică, comparativă, de expertiză, statistică, statistică variațională, analitică.
5. În urma revizuirii sistematice am obținut cea mai bună estimare posibilă a veridicității prevalenței adenoamelor hipofizare la populația generală.
6. Variația între studii am depășit prin utilizarea efectelor aleatorii, am estima prevalența populației utilizând un algoritm de ponderare inversă în care greutatea sunt estimate din variația studiului.
7. Inferența statistică bazată pe coeficientul de corelație al lui Pearson a permis să obținem un interval de încredere care, la eșantionarea repetată, micșorează erorile de calcul.

3. ADENOAMELE HIPOFIZARE: HISTOPATOLOGIE ȘI PROFIL MOLECULAR

3.1. Evaluarea rezultatelor morfologice convenționale

Toate cele 96 de cazuri incluse în studiu au fost evaluate microscopic pe speciamentele colorate cu hematoxilină eozină de către trei patologi cu experiență conform recomandărilor OMS în vigoare. Dintre acestea, 10 cazuri au fost reprezentate de țesut hipofizar normal pentru a putea compara morfologia hipofizei normale cu aspectul microscopic al diferitelor tipuri de adenoame hipofizare.

Țesutul de hipofiză normală a derivat în majoritatea cazurilor de la nivelul adenohipofizei, doar două specimene au prezentat și țesut de neurohipofiză. Celulele adenohipofizei au fost așezate în cuiburi, demarcate de o rețea omogenă de țesut conjunctiv, ce a inclus o rețea foarte bine dezvoltată de capilare sanguine (Figura 3.1a). Structura normală a adenohipofizei a respectat eterogenitatea celulară bine cunoscută, fiind formată din celule acidofile, bazofile și cromofobe dispuse în grupuri (Figura 3.1b). Rețeaua vasculară a fost alcătuită din capilare cu lumen larg, delimitate de celule endoteliale evidente, densitatea vasculară fiind crescută semnificativ (Figura 3.1c).

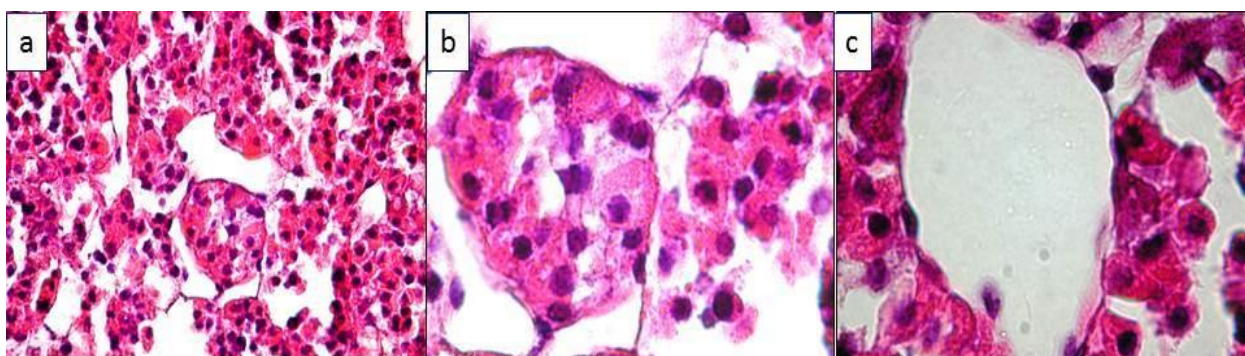


Fig. 3.1. Aspecte histologice ale hipofizei umane normale raportate la morfologia cuiburilor de celule endocrine (a), tinctorialitatea celulară (b) și rețeaua vasculară (c)

Adenoamele hipofizare au fost caracterizate prin dezorganizarea arhitecturală specifică a hipofizei normale și, prin predominanța sau absența unuia sau mai multor tipuri celulare specifice hipofizei normale. Din aceste motive, evaluarea histopatologică a avut drept criteriu de încadrare pattern-ul morfologic tumoral (difuz sau compact, papilar, trabecular, fusiform și alveolar), și tinctorialitatea celulelor din structura adenoamelor hipofizare (acidofile, bazofile, cromofobe).

Astfel, din cele 86 de cazuri de adenoame hipofizare, 31 au avut un pattern difuz (solid), (Figura 3.2a), 34 au fost de tip papilar (Figura 3.2b), 11 – de tip trabecular (Figura 3.2c), 3 au inclus arii cu celule fusiforme (Figura 3.2d), 7 au avut un aspect alveolar (Figura 3.2e) și 31 au avut un pattern mixt. Pentru pattern-ul mixt, am constatat următoarele variante: acidofil-bazofil (AB, Figura 3.2f), acidofil-cromofob (AC, Figura 3.2g) și bazofil-cromofob (BC, Figura 3.2h).

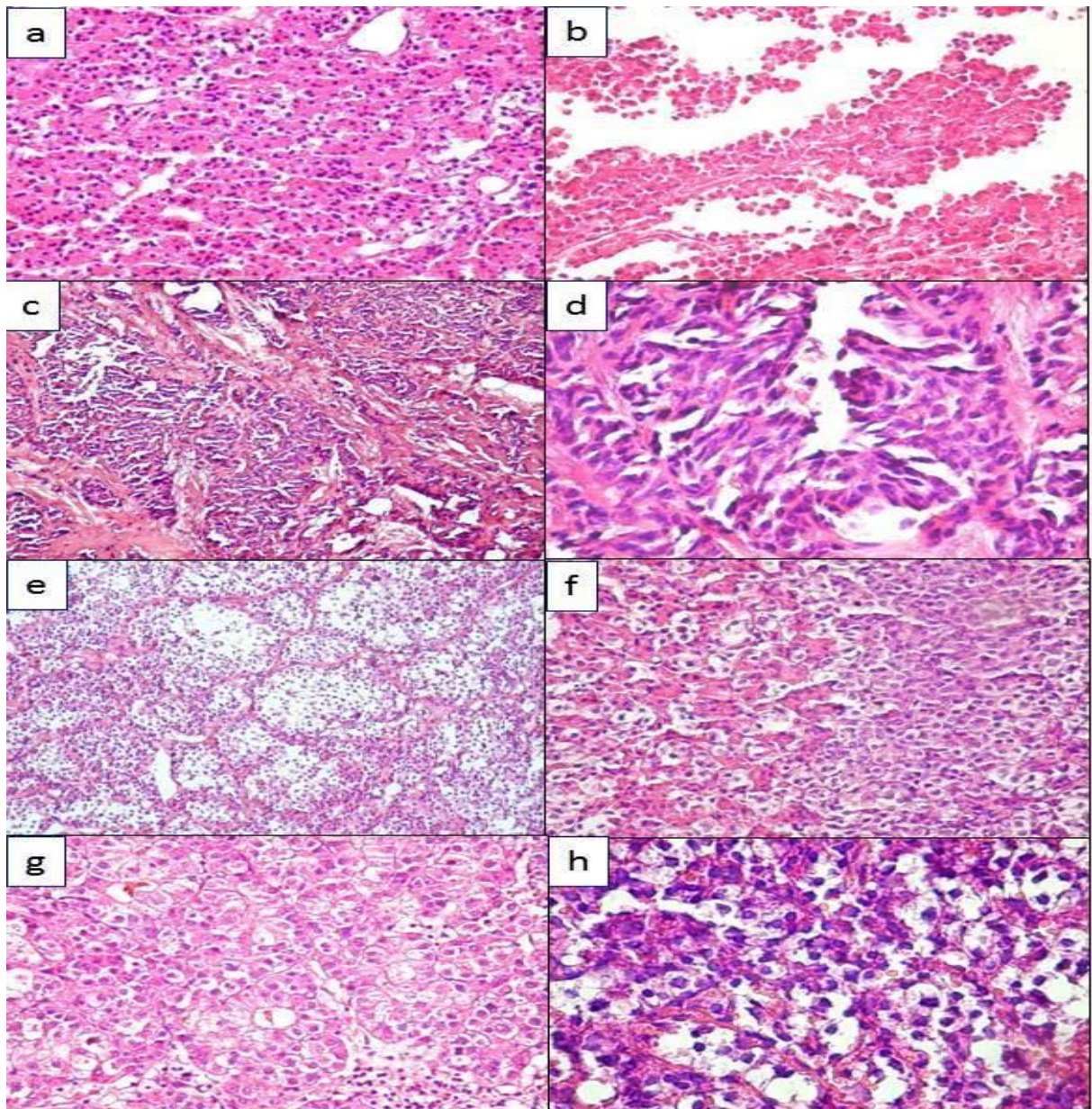


Fig. 3.2. Pattern-uri de creștere în adenoamele hipofizare:
solid (a), papilar(b), trabecular(c), fusiform(d), alveolar (e)și mixt AB(f), AC(g) și BC(h)

Din numărul total de cazuri cu pattern de creștere solid, 27% au fost de tip acidofil, 4% – de tip bazofil, 17% – de tip cromofob și 23% – de tip mixt. Din totalul cazurilor mixte cu pattern solid, 67% au prezentat o componență celulară constituită din celulele acidofile și cromofobe (AC), 22% au fost de tip bazofil-cromofob (BC) și doar 11% – de tip acidofil-bazofil (AB).

În ceea ce privește pattern-ul papilar, 32% din cazuri au fost adenoame hipofizare de tip acidofil, 37% – de tip bazofil, 10% – de tip cromofob și 16% – de tip mixt. În cadrul celor de tip mixt, cu pattern papilar, 66% au fost de tip BC, pe când 33% – de tip AC.

Pattern-ul trabecular s-a constatat în 8% din totalul cazurilor. Dintre acestea, 60% au fost de tip acidofil, 20% – de tip bazofil și 20% – de tip cromofob. În cazul adenoamelor hipofizare mixte, nu s-a observat prezența pattern-ului trabecular.

Celelalte două tipuri de creștere – pattern-ul alveolar și cel fusiform – au fost întâlnite în proporții egale în studiul nostru. Fiecare dintre acestea au reprezentat 5% din numărul total.

Pentru cazurile cu pattern de creștere fusiform, distribuția a fost egală între tipurile acidofil, bazofil și cromofob și nu s-a vizualizat în grupul adenoamelor hipofizare de tip mixt. În schimb, tipul alveolar a fost specific adenoamelor hipofizare cromofobe (67%) și mixte (33%), fiind absent în tipurile histopatologice acidofil și bazofil.

Evaluarea histopatologică a adenoamelor hipofizare în funcție de tinctorialitatea celulară. Conform tinctorialității celulare, adenoamele hipofizare incluse în studiu au fost clasificate în acidofile, bazofile, cromofobe și mixte.

Din totalul de cazuri evaluate, 43% au fost de tip acidofil, 17% de tip bazofil, 18% de tip cromofob și 22% de tip mixt. Procentul și distribuția grafică a cazurilor studiate în raport cu tinctorialitatea celulelor componente poate fi redată schematic ca în Figura 3.3.

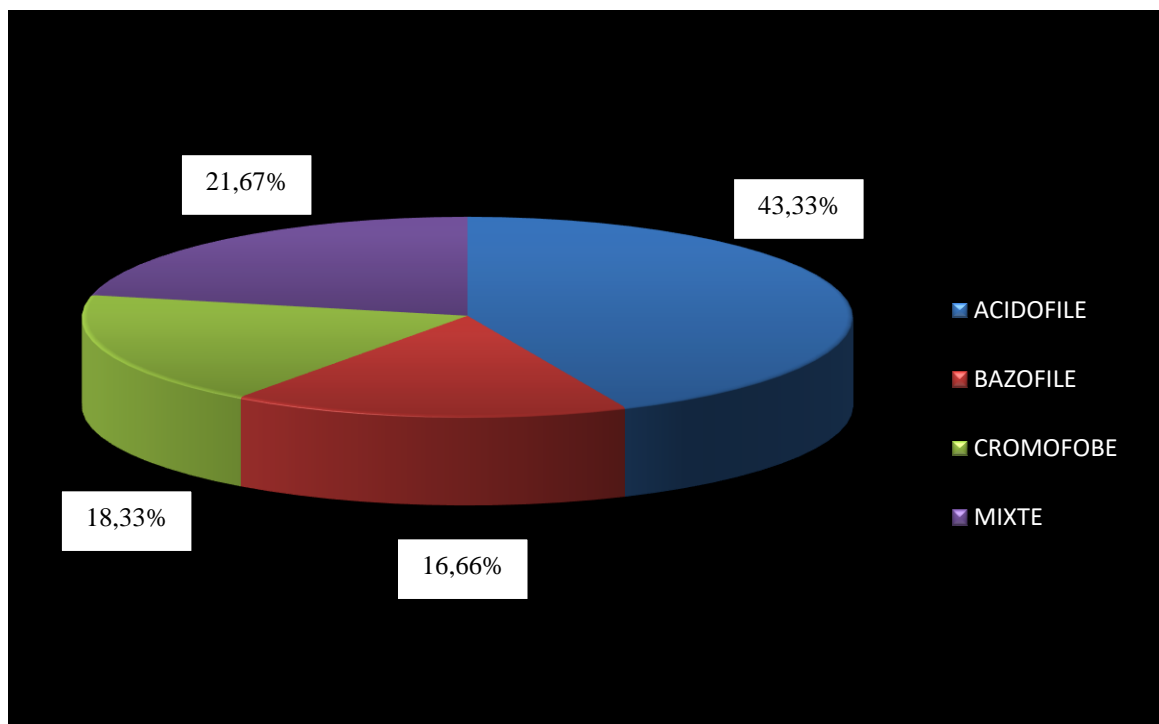


Fig. 3.3. Procentul și distribuția grafică a cazurilor de adenoame hipofizare studiate în funcție de tinctorialitatea celulelor care intră în componența lor. De remarcat predominanța adenoamelor hipofizare de tip acidofil și mixt.

Adenoamele hipofizare de tip acidofil au fost constituite din celule tumorale cu citoplasma intens acidofilă, cu aspect granular, cu nucleu rotund euromatic, și raportul nucleocitoplasmatic în favoarea citoplasmei (Figura 3.4a). Au fost observate celule acidofile de dimensiuni mari, de formă rotundă, ovalară sau poligonală cu limitele bine definite, dispuse relativ compact fiind organizate sub formă de plaje tumorale (Figura 3.4b) sau grupuri mici asociate axului papilar (Figura 3.4c).

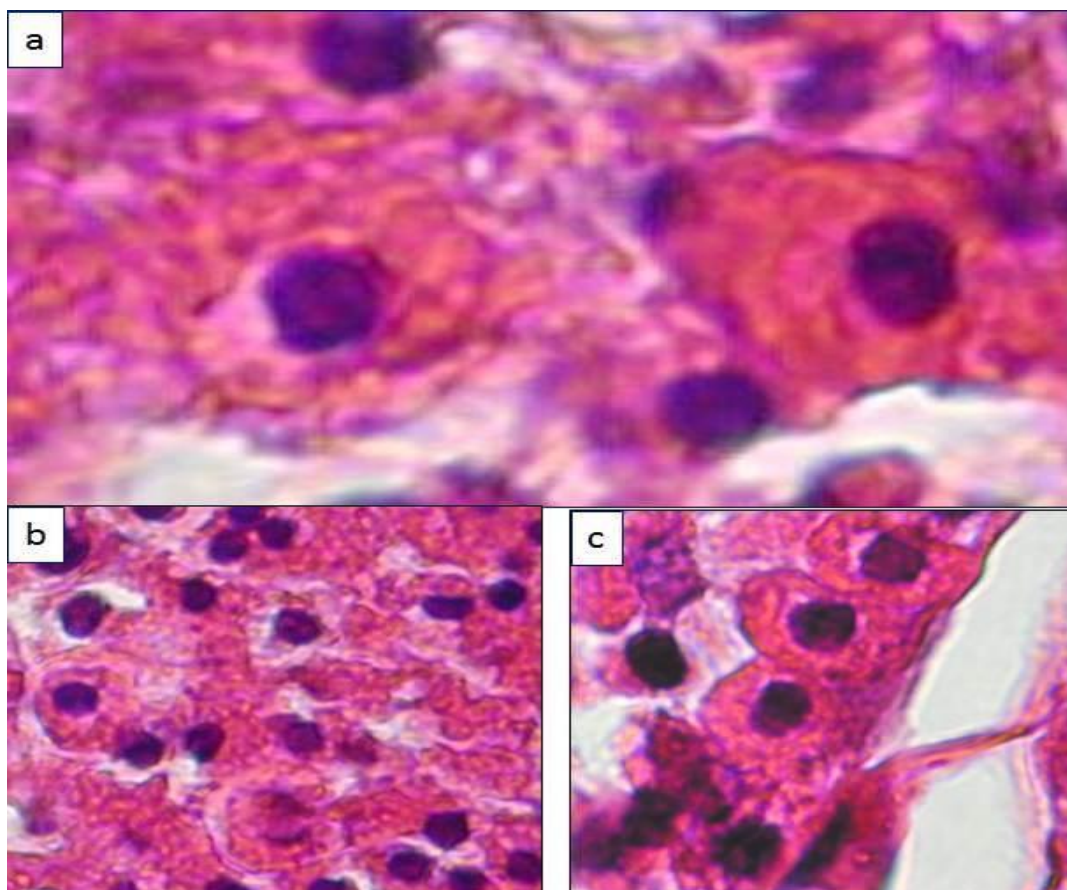


Fig 3.4. Microscopia adenomului hipofizar de tip acidofil. (a, b, c,)

Specimenele de adenoame hipofizare cu celule bazofile au prezentat în componenta lor grupuri de celule de dimensiuni mici, cu citoplasmă bazofilă, de asemenea granulară și nucleu rotund, intens colorat. Majoritatea celulelor au fost grupate în arii compacte separate de o cantitate redusă de țesut conjunctiv (Figura 3.5a). Adenoamele hipofizare cu celule cromofobe au fost constituite din celule cu citoplasma clară, cu nucleul rotund sau ovalar dispus de cele mai multe ori excentric (Figura 3.5b).

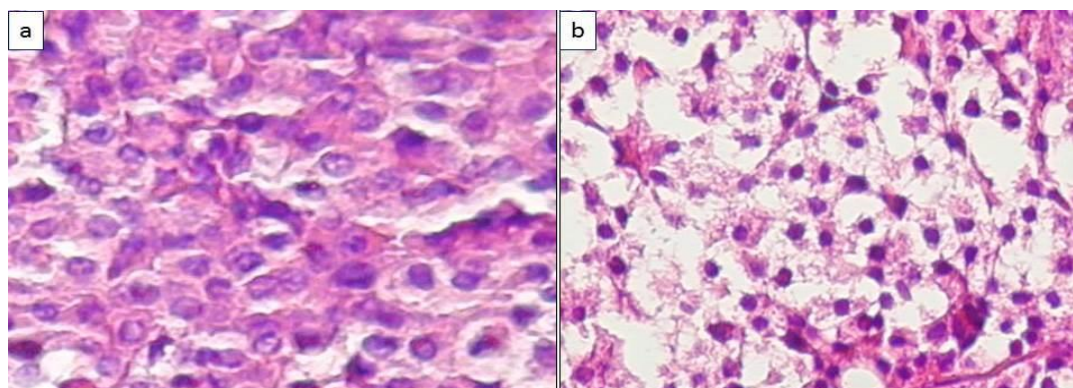


Fig. 3.5. Aspectul histopatologic al adenomaleor hipofizare de tip bazofil (a) și cromofob (b).

Adenoamele hipofizare mixte au fost constituite cel mai frecvent din arii de celule acidofile (Figura 3.6a) sau bazofile (Figura 3.6b) mixate cu arii de celule tumorale cromofobe. Într-un număr redus de cazuri s-a observat tipul de adenom hipofizar mixt acidofil-bazofil (Figura 3.6c).

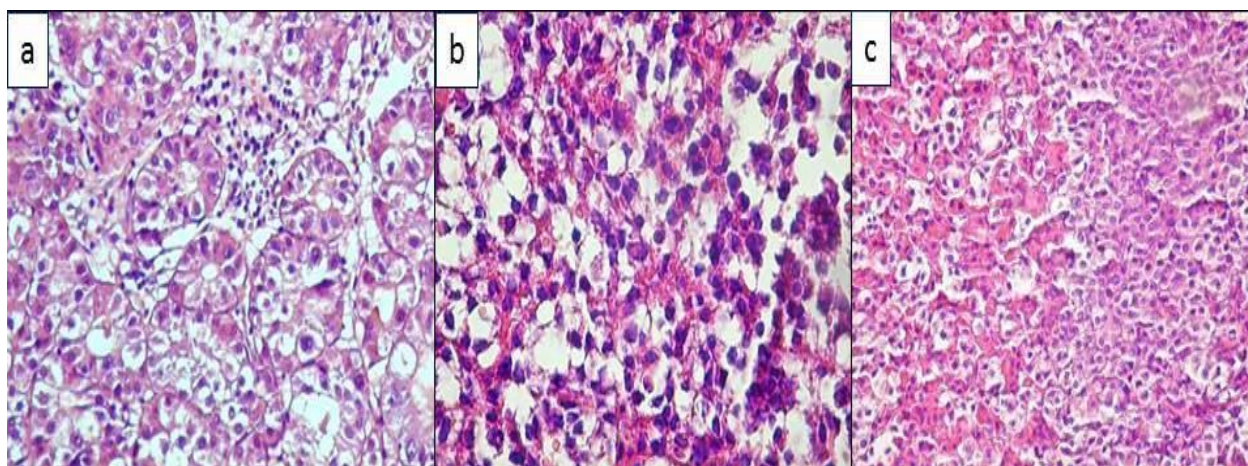


Fig. 3.6. Adenoame hipofizare mixte: AC (a), BC (b) și AB (c). De remarcat proporția redusă a componentei cromofobe și predominanța componentelor acidofile sau bazofile. În cazurile de adenoame AB proporția celor două componente a fost aproximativ egală.

Clasificarea adenoamelor hipofizare în acidofile, bazofile, cromofobe și mixte a fost dublată de prezența unei eterogenități a patternului de creștere în cadrul fiecărui subgrup.

Peste jumătate din cazurile de adenoame hipofizare cu celule acidofile (58%) au prezentat un pattern de creștere solid, cu arii tumorale compuse din celule acidofile dispuse compact, fără țesut conjunctiv interpus și cu o densitate scăzută de vase capilare decelabile la examenul histopatologic comparativ cu hipofiza normală (Figura 3.7a,b). Ca frecvență, patternul solid (difuz) a fost urmat de cel papilar, întâlnit în 23% din cazurile de adenoame hipofizare cu celule acidofile. Axe conjunctive fine, foarte bine vascularizate au fost tapetate de 2-4 rânduri de celule cu citoplasmă acidofilă (Figura 3.7c). Pattern-ul trabecular (Figura 7d) a reprezentat 12% din totalul adenoamelor acidofile și pattern-ul fusiform (Figura 3.8e) doar 4%. Reprezentarea grafică a distribuției adenoamelor hipofizare cu celule acidofile în funcție de pattern-ul de creștere este schematizat în Figura 3.7e.

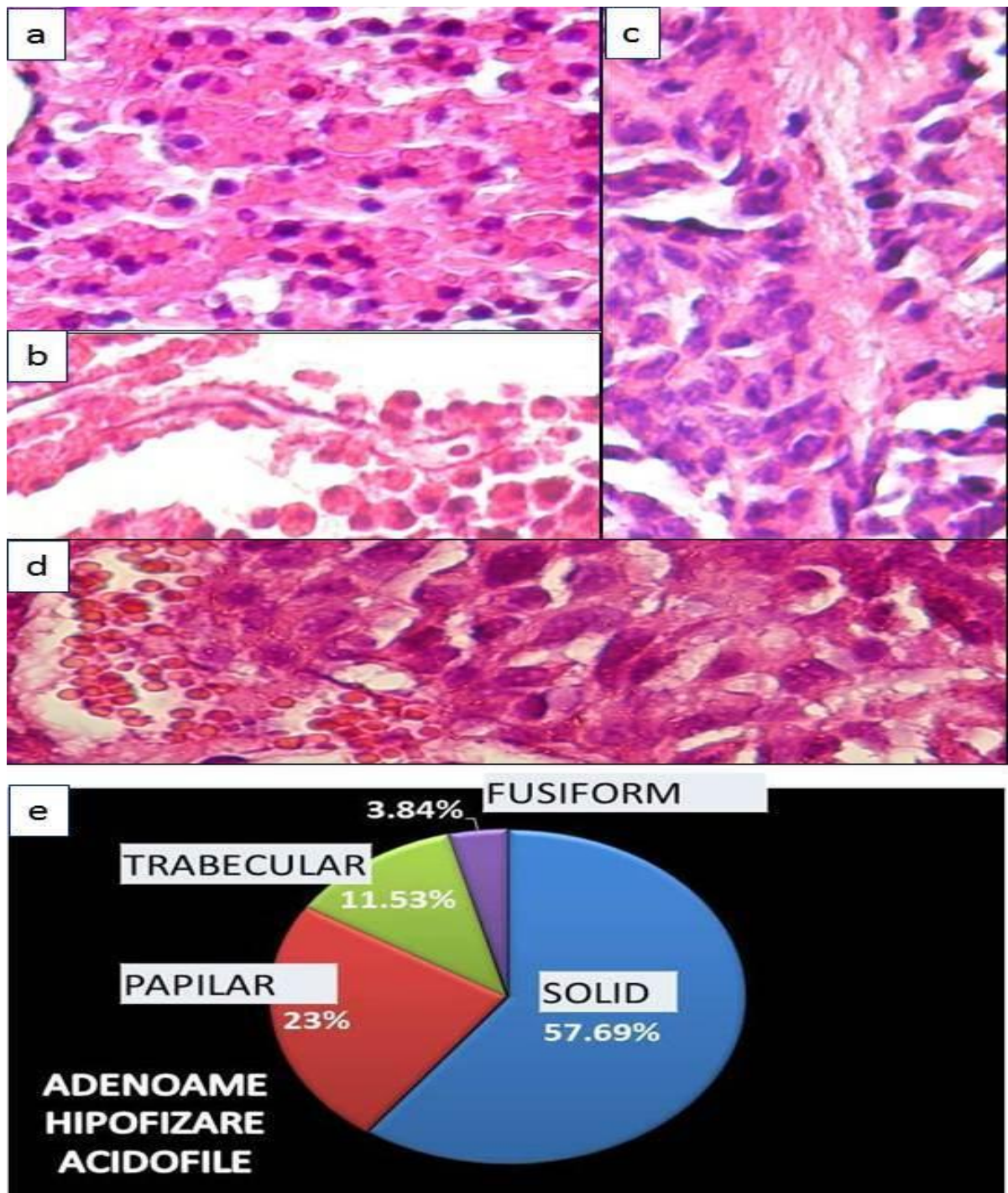


Fig. 3.7.a, b, c, d Clasificarea adenoamelor dublată de prezența heterogenității patternului de creștere în cadrul fiecărui subgrup. 7e. Reprezentarea grafică a distribuției adenoamelor hipofizare.

Adenoamele hipofizare cu celule bazofile au reprezentat un grup aparte din punct de vedere histopatologic și, ulterior din punct de vedere al profilului hormonal, dar acest aspect va fi discutat la capitolul respectiv. Tipul papilar a predominat pentru adenoamele hipofizare

cu celule bazofile (70% din numărul total de cazuri). Restul de 30% a fost împărțit în proporții egale (10% fiecare) între tipurile solid, trabecular și fusiform.

Adenoamele cu celule cromofobe au fost foarte heterogene din punct de vedere al pattern-ului de creștere. Dacă pentru adenoamele bazofile, patternul papilar poate fi considerat specific, pentru cele cromofobe am întâlnit doar 18% pattern papilar (Figura 3.8a), cel solid fiind considerat predominant 45% (Figura 3.8b). Tipul alveolar (18%, Figura 3.8c), trabecular (9%, Figura 3.8d) și fusiform (9%, Figura 3.8e) au completat tabloul heterogen al adenoamelor hipofizare de tip cromofob.

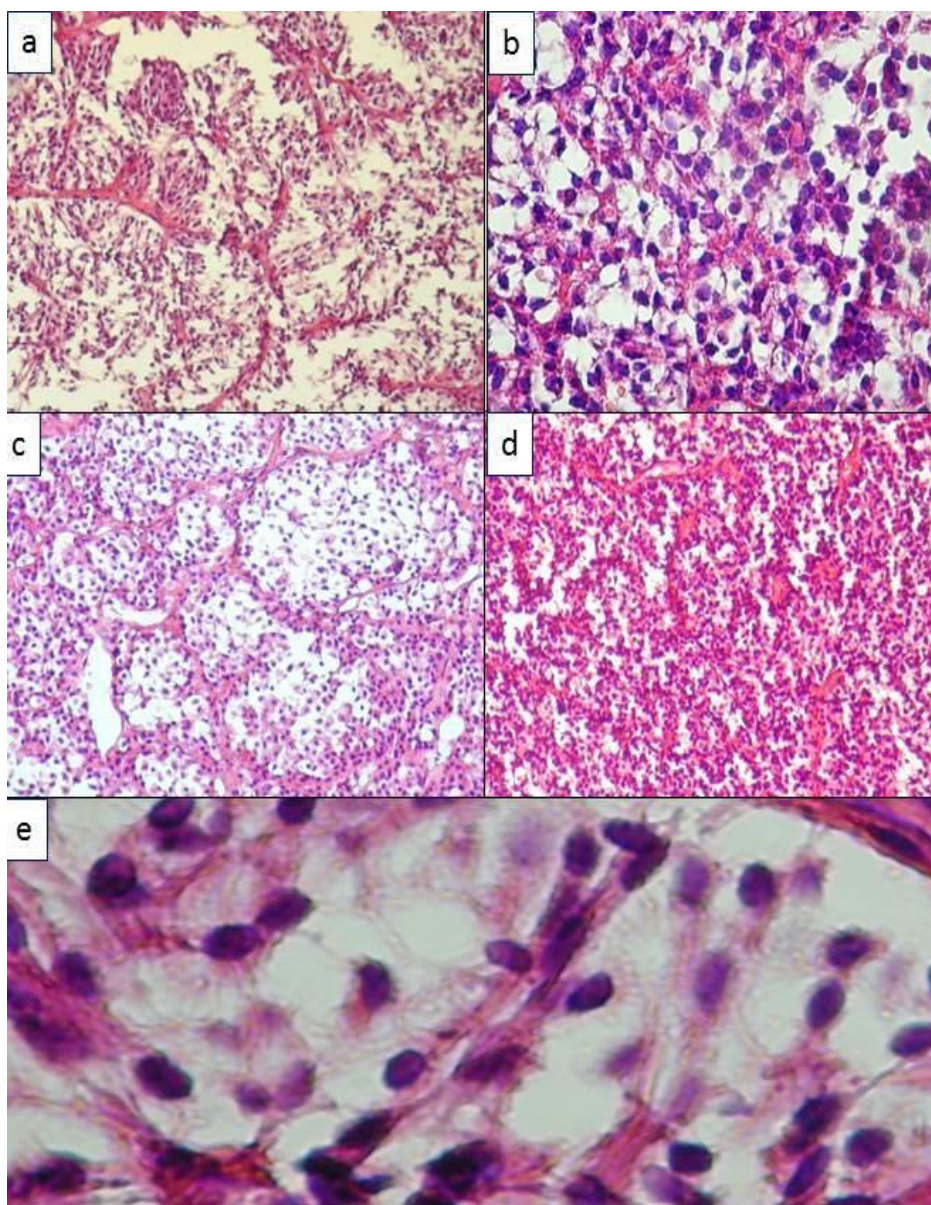


Fig. 3.8. Adenoame hipofizare cromofobe cu pattern de creștere papilar (a.), solid (b), alveolar (c), trabecular (d) și fusiform (e).

Adenoamele hipofizare de tip mixt au fost definite ca un amestec de celule acidofile, bazofile și cromofobe. În studiul de față au fost înregistrate 3 tipuri de adenoame hipofizare mixte: cele care conțin celule acidofile și bazofile (AB), adenoame cu celule predominant acidofile mixate cu celule cromofobe (AC) și adenoame mixte predominant cu celule bazofile însoțite de prezența celulelor cromofobe (BC). Tipul AC a reprezentat 61,53% din totalul adenoamelor mixte, fiind urmat de tipul BC (30,76%) și AB (7,71%). Diagrama distribuției cazurilor de adenoame hipofizare conform pattern-ului de creștere dependent de tipul celular este prezentată în figura 3.9.

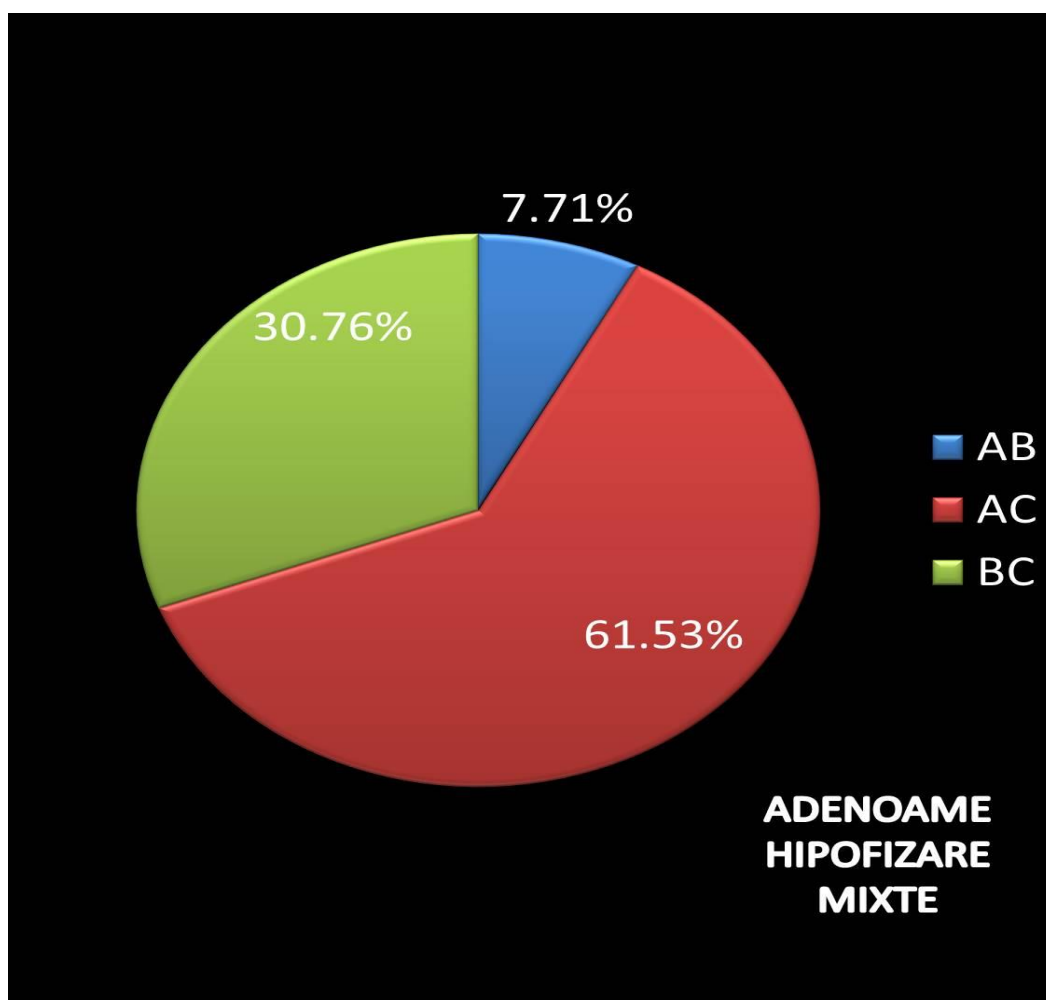


Fig. 3.9. Distribuția cazurilor de adenoame hipofizare mixte incluse în studiu.

Discuții. Adenoamele hipofizare reprezintă aproximativ 10-15% din totalul tumorilor diagnosticate la nivel cerebral [38]. Afectează predominant femeile [301], iar prezența lor în copilărie este extrem de rară dar, atunci când există, astfel de tumori sunt mult mai agresive decât cele apărute în perioada adultă [142]. Clasificarea adenoamelor hipofizare doar pe baza

diagnosticului histopatologic convențional nu mai este în prezent acceptată fără realizarea profilului hormonal prin metoda imunohistochimică. Totuși, diagnosticul inițial rămâne un aspect important în evaluarea adenoamelor hipofizare.

Morfologic, adenoamele hipofizare sunt constituite din celule acidofile, bazofile și cromofobe iar pentru adenoamele hipofizare mixte, combinații ale celor trei tipuri de celule pot fi întâlnite în proporții variabile.

Prin introducerea profilului hormonal al adenoamelor hipofizare bazat pe expresia apare să scadă în importanță, mai ales în centrele cu o dotare superioară a laboratoarelor de anatomie patologică.

Evaluarea histopatologică pe care am realizat-o în cadrul prezentului studiu a fost necesară din mai multe motive. Primul și, poate cel mai important este acela că, cercetarea de față reprezintă prima evaluare globală a adenoamelor hipofizare din Republica Moldova, inițial din punct de vedere morfologic, completat bineînțeles și de profilul hormonal, pe un număr de cazuri relativ mare.

Astfel, pattern-ul de creștere solid a fost caracterizat prin predominanța celulelor acidofile, și într-o mică măsură a celor cromofobe și bazofile. În schimb, adenoamele hipofizare de tip papilar au fost constituite predominant din celule bazofile. Tipul alveolar a inclus adenoamele hipofizare cu celule cromofobe predominant. În tipul trabecular, proporția celor trei tipuri celulare a fost aproximativ egală [202].

Tinctorialitatea celulară de tip acidofil a predominat în lotul inclus în studiu de adenoame hipofizare din aria Republicii Moldova. Aceasta este în concordanță cu datele raportate anterior de Bălinișteanu și colaboratorii care, dintr-un număr total de 142 adenoame hipofizare colectate din România, au diagnosticat 104 cazuri de adenoame de tip acidofil [12]. De asemenea, aceiași autori au prezentat pattern-ul de creștere solid ca fiind predominant în aproximativ 59% din totalul cazurilor, procent care este apropiat de cel găsit pentru cazurile colectate din Republica Moldova. Discordanțe în ceea ce privește celelalte pattern-uri de creștere s-au înregistrat pentru tipul papilar, acesta fiind mai frecvent în Republica Moldova, comparativ cu România. De asemenea, numărul cazurilor de adenoame hipofizare cu celule cromofobe a fost semnificativ mai ridicat pentru lotul studiat în Republica Moldova comparativ cu cel studiat pentru cazurile din România. Acest aspect de predominanță a celulelor cromofobe a fost raportat și de alți autori. În 1982, Felix și colaboratorii au raportat un număr de adenoame hipofizare cromofobe similar cu cel al adenoamelor cu celule acidofile, aproximativ un procent de 30% din totalul cazurilor incluse în studiu [82] dar aceste date sunt extrem de rare.

Datele de mai sus sugerează influența tipului celular asupra pattern-ului de creștere al adenoamelor hipofizare. Recent, Monsalvez și colaboratorii [214] au publicat date referitoare la corelația dintre pattern-ul de creștere, aspectele histopatologice și parametrii clinici. Autorii au demonstrat corelația dintre pattern-ul de creștere preoperator și postoperator precum și corelația dintre acesta și vârstă sau sex. Date despre aspectele de tinctorialitate celulară sau pattern de creștere histopatologic nu au fost citate în cadrul aceluiași studiu.

Clasificarea histopatologică dependentă de tinctorialitate sau pattern-ul de creștere a fost declarată ca fiind inefficientă datorită corelației slabe întâlnite între aspectele microscopice și profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Impactul slab al clasificării histopatologice convenționale nu a inclus însă corelația cu alți potențiali factori de prognostic și /sau terapeutici ce ar putea avea implicații în patogeneza adenoamelor hipofizare. Considerațiile inițiale conform cărora adenoamele hipofizare cu celule acidofile secretă predominant GH și cele cromofobe sunt non secretorii (nule) au fost demontate de profilul imunohistochimic care le-a contrazis parțial.

În prezent nu există date referitoare la corelația dintre indicele de proliferare, tipurile citologice și pattern-ul de creștere în adenoamele hipofizare.

3.2. Profilul hormonal identificat imunohistochimic GH, prolactină, ACTH, TSH, FSH, LH

În prezent, este bine cunoscut faptul că, evaluarea histopatologică nu mai este unanim acceptată ca metodă unică de diagnostic al adenoamelor hipofizare. Evaluarea inițială, bazată pe criteriile morfologice este obligatoriu de a fi completată de un profil hormonal cât mai bine certificat. Din acest motiv, în prezent diagnosticul adenoamelor hipofizare combină aspectele histopatologice cu profilul hormonal, foarte util în special în cazul adenoamelor plurihormonale.

Pe baza datelor prezentate mai sus, studiul nostru a continuat cu elaborarea profilului hormonal pentru fiecare caz în parte și reclasificarea adenoamelor hipofizare în corelație cu acesta. Evaluarea imunohistochimică a inclus șase tipuri de hormoni: GH, PRL, ACTH, TSH, FSH și LH. Evaluarea microscopică și clasificarea adenoamelor hipofizare conform profilului hormonal s-a realizat pe contul procentului de celule pozitive și a intensității reacției.

Adenoamele hipofizare care au exprimat un singur hormon au fost considerate adenoame hipofizare pure. Cele care au exprimat două tipuri hormonale ca de exemplu GH-PRL, GH-TSH sau FSH-LH au fost clasificate ca și adenoame hipofizare de tip mixt.

În cazul în care adenoamele hipofizare au prezentat reacție imunohistochimică pozitivă la trei sau mai mulți hormoni, și la cel puțin doi dintre ei reacția a fost notată cu +2 sau +3, iar la ceilalți cu +1, acestea au fost clasificate drept adenoame hipofizare plurihormonale.

Au existat cazuri la care nici unul dintre hormonii menționați nu a fost pozitiv iar testele adiacente pentru realizarea diagnosticului diferențial cu alte tipuri tumorale din regiunea capului și gâtului au fost de asemenea negative. Aceste cazuri au fost incluse în grupul adenoamelor hipofizare non-secretante (non funcționale).

Evaluarea imunohistochimică a profilului hormonal s-a realizat de asemenea și pe cele 10 cazuri de țesut hipofizar normal, fiind urmărite numărul și intensitatea celulelor pozitive dar și distribuția diferitelor tipuri celulare ale adenohipofizei în cadrul structurilor histologice normale specifice hipofizei umane.

Reacția imunohistochimică pozitivă care a fost luată în considerare pentru evaluarea hormonilor hipofizari a fost restricționată la nivelul citoplasmei celulelor tumorale și a avut un aspect granular (în cele mai multe cazuri) dar și un aspect difuz, omogen, în special pentru ACTH, FSH și LH.

Hipofiza normală a exprimat toate tipurile de hormoni. Celulele GH pozitive au predominat fiind organizate în cuiburi sau cordoane. Reacția a fost omogenă cu o intensitate mare, și patternul citoplasmatic granular. Celulele pozitive la PRL au urmat ca densitate după

cele secretante de GH. Celulele ACTH pozitive au fost organizate în structuri cu aspect de pseudorozete sau pseudofoliculi. Densitatea cea mai mică a fost înregistrată pentru celulele FSH și LH secretante. Acestea au fost distribuite omogen în structura hipofizei dar izolate unele față de altele. Rar s-a înregistrat distribuția celulelor FSH și LH pozitive în grupuri mici. Aspectele și particularitățile imunohistochimice ale profilului hormonal din hipofiza normală sunt evidențiate în Figura 3.10.

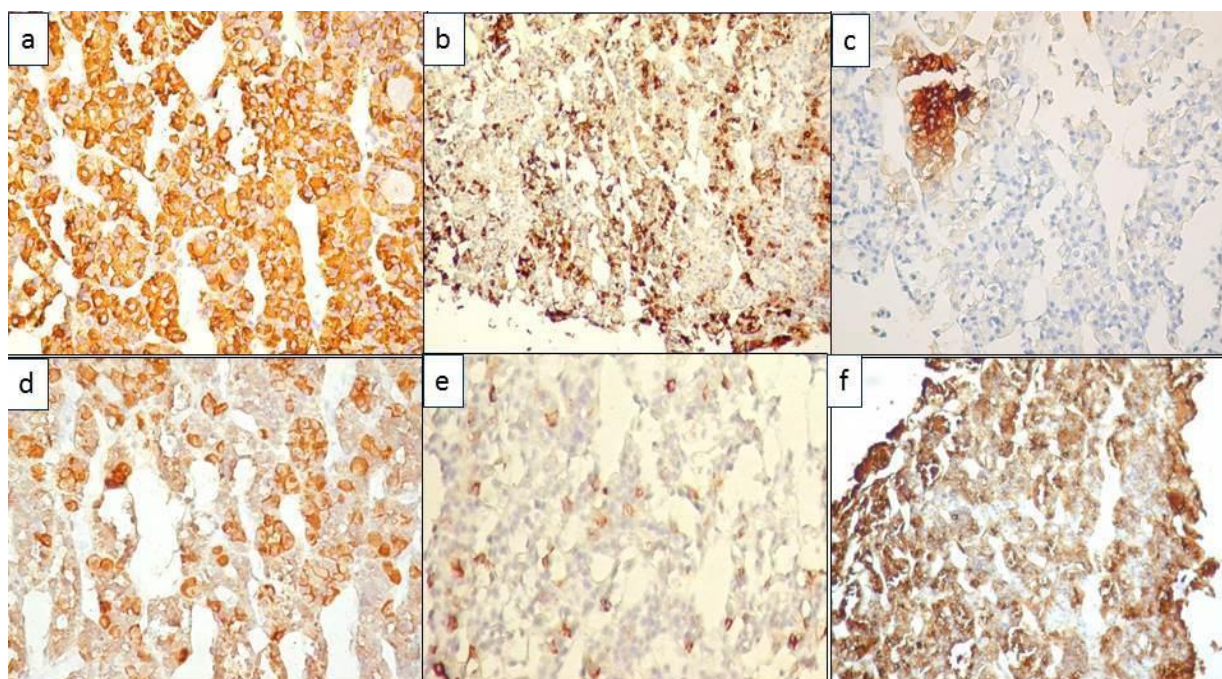


Fig. 3.10. Mapping-ul celulelor endocrine din hipofiza normală. Celule secretante de GH (a), PRL (b), TSH (c), ACTH (d), FSH (e) și LH (f)

Heterogenitatea celulară și funcțională a hipofizei normale s-a reflectat și în profilul hormonal al adenoamelor hipofizare incluse în studiul de față.

Raportat la numărul total de cazuri, adenoamele hipofizare pure au reprezentat un procent de 33,34%. Ca distribuție corelată cu tipurile hormonale cele mai numeroase cazuri de adenoame hipofizare pure au fost reprezentate de cele LH pozitive urmate de adenoamele hipofizare GH secretante și de prolactinoame. Adenoamele hipofizare TSH și ACTH secretante au fost reprezentate în proporții egale. Raportarea procentuală a tipurilor de adenoame hipofizare pure este redată în Figura 3.11.

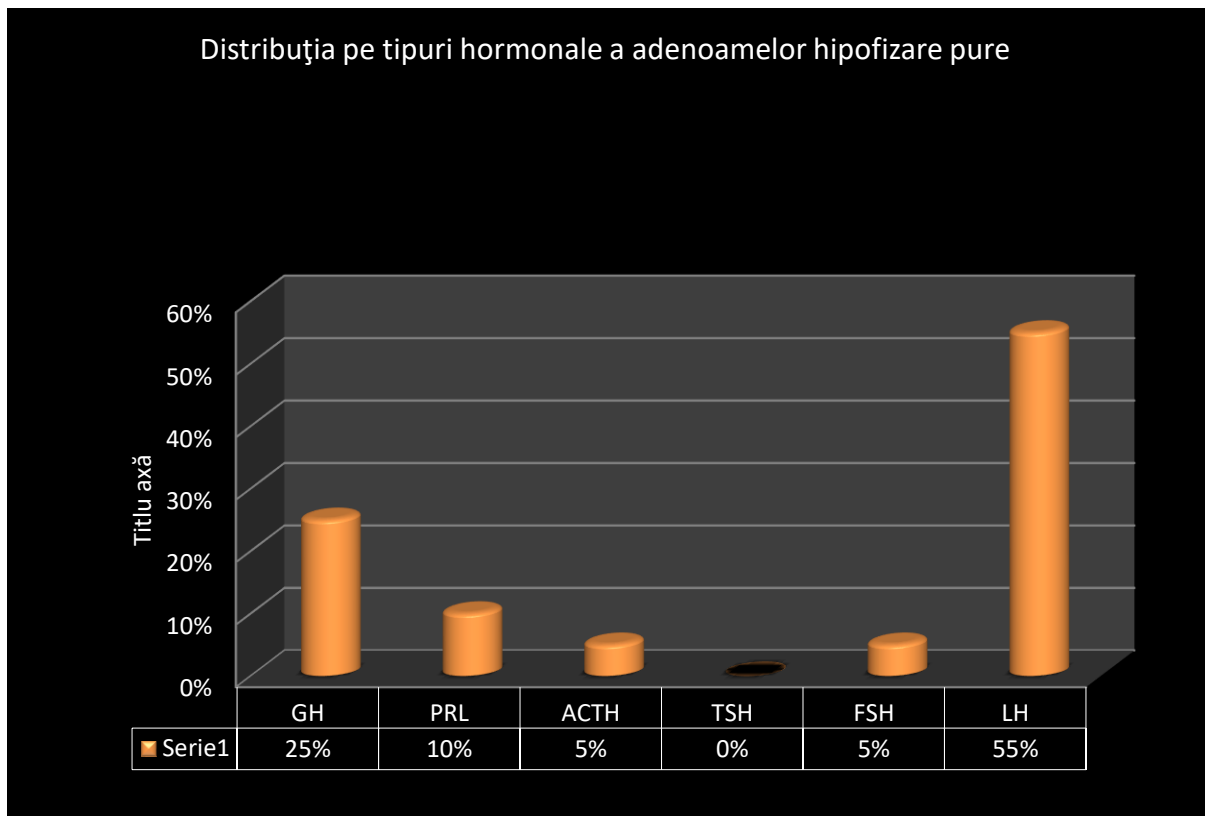


Fig. 3.11. Procentul de adenoame hipofizare pure, raportat la fiecare tip hormonal.

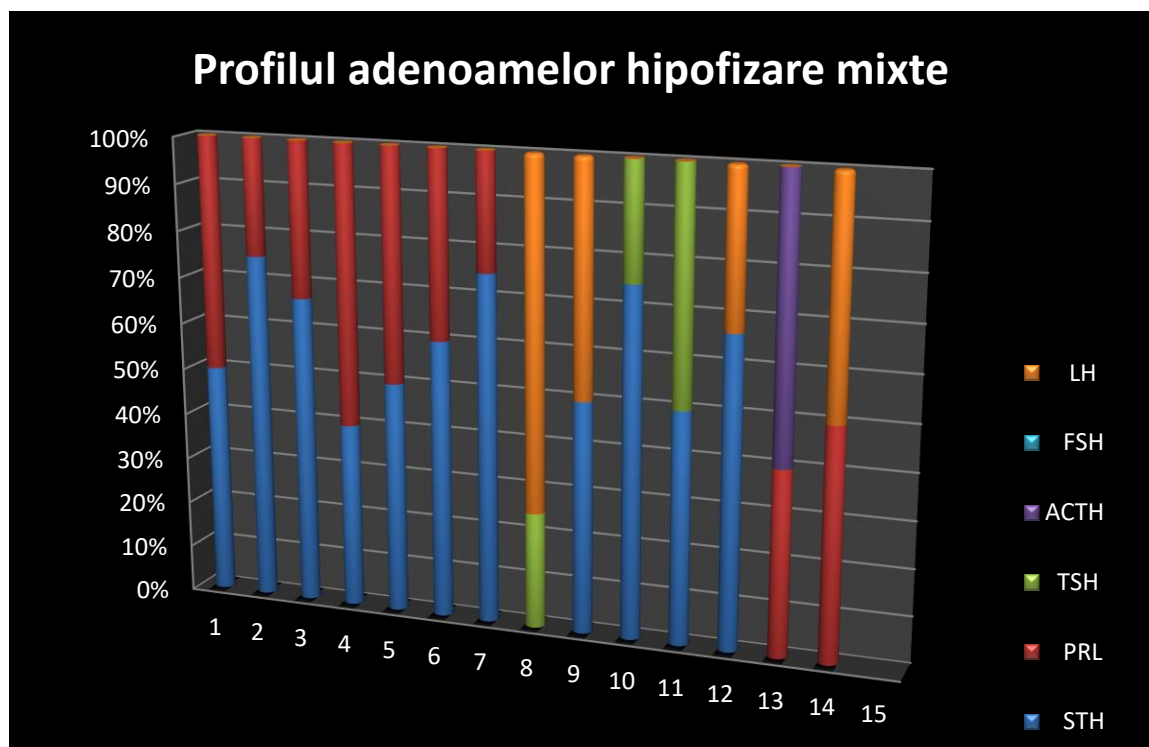


Fig. 3.12. Raportul procentual al adenoame hipofizare mixte.

Expresia imunohistochimică a fiecărei asocieri este prezentată în Figura 3.13. Așa cum rezultă din descrierea de mai sus, cea mai frecventă asocieri a fost realizată de GH care s-a co-exprimit practic cu toate celelalte tipuri de hormoni. Expresia GH a fost întotdeauna de intensitate moderată și mare în cadrul acestei asocieri în comparație cu ceilalți hormoni pentru care a predominat o intensitate slabă, în foarte rare cazuri fiind întâlnită o intensitate moderată sau mare. În cadrul asocierilor dintre GH și alte tipuri de hormoni, s-a întâlnit un pattern de distribuție particular pentru asocierile GH-TSH și GH-ACTH.

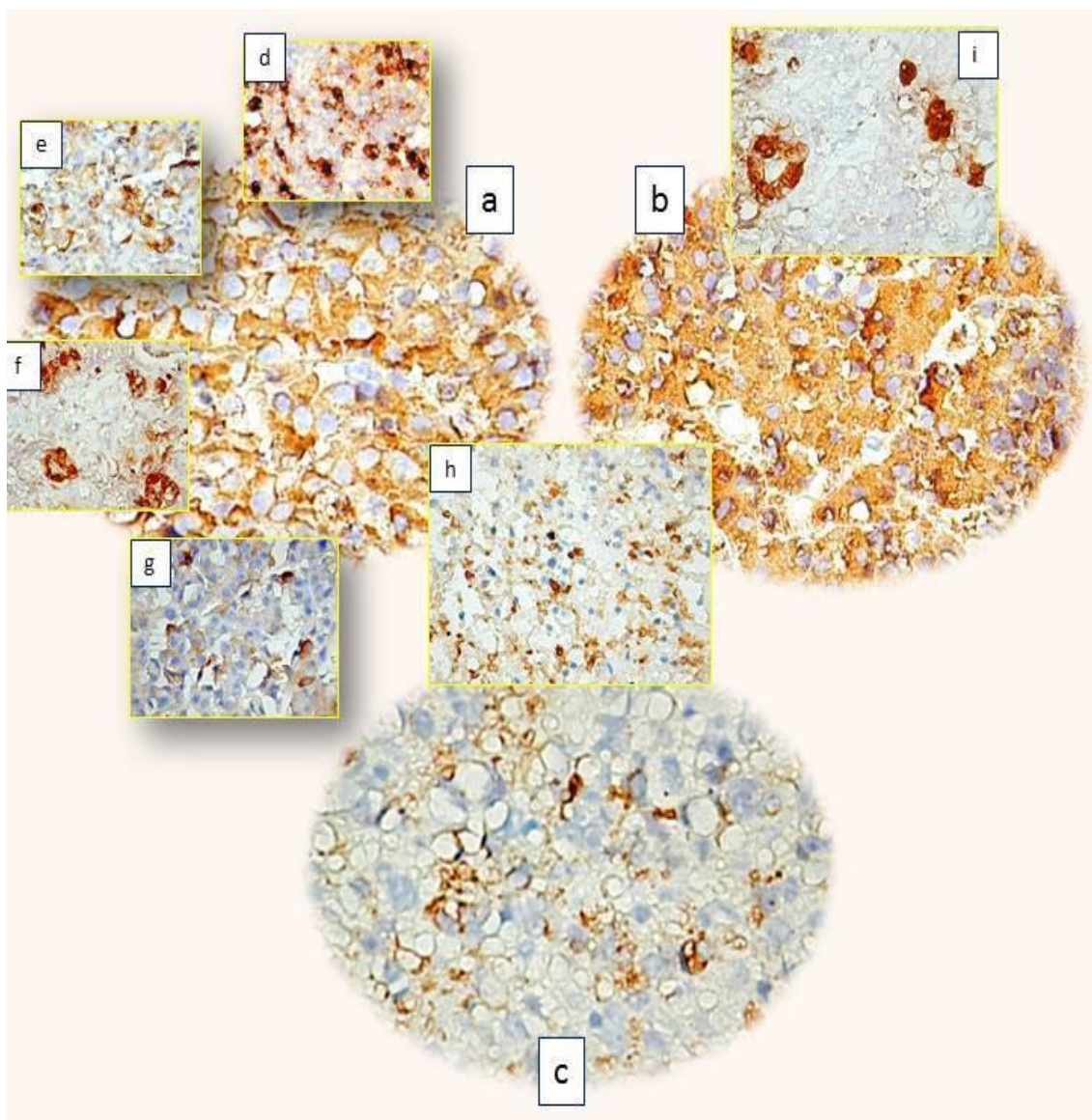


Fig. 3.13. Expresia imunohistochimică a asocierilor întâlnite în cadrul adenoamelor hipofizare mixte care secretă două tipuri hormonale. GH-PRL (a, d), GH-TSH (a, e), GH-ACTH (a, f), GH-FSH (a, g) și GH-LH (a, h) PRL-LH (b, h), PRL-ACTH (b, i), și FSH-LH (c, h).

Astfel, dacă pentru alte asocieri atât celulele GH pozitive cât și cele care au exprimat ceilalți hormoni au avut o distribuție difuză omogenă, pentru asocierile de tip GH-TSH spre exemplu, celulele GH secretante și-au păstrat pattern-ul de distribuție difuz (Figura 3.14a) în timp ce, cele TSH pozitive au fost organizate în structuri compacte, care au format grupuri mici, cu aspect insular distribuite în interiorul ariilor difuze GH pozitive (Figura 3.14b). Pentru asocierea GH-ACTH s-a păstrat aspectul de “hot-spot” al distribuției ariilor ACTH pozitive, cu particularitatea că celulele ACTH pozitive au fost organizate sub formă de pseudofoliculi, rozete sau cordoane, dispuse în interiorul ariilor GH pozitive (Figura 3.14c). S-a observat o intensitate heterogenă a celulelor ACTH pozitive, atât în interiorul ariilor cu aspect pseudofolicular și în interiorul cordoanelor de celule secretoare de ACTH. Heterogenitatea expresiei ACTH a fost caracterizată printr-o alternanță de intensitate moderată și mare a expresiei imunohistochimice.

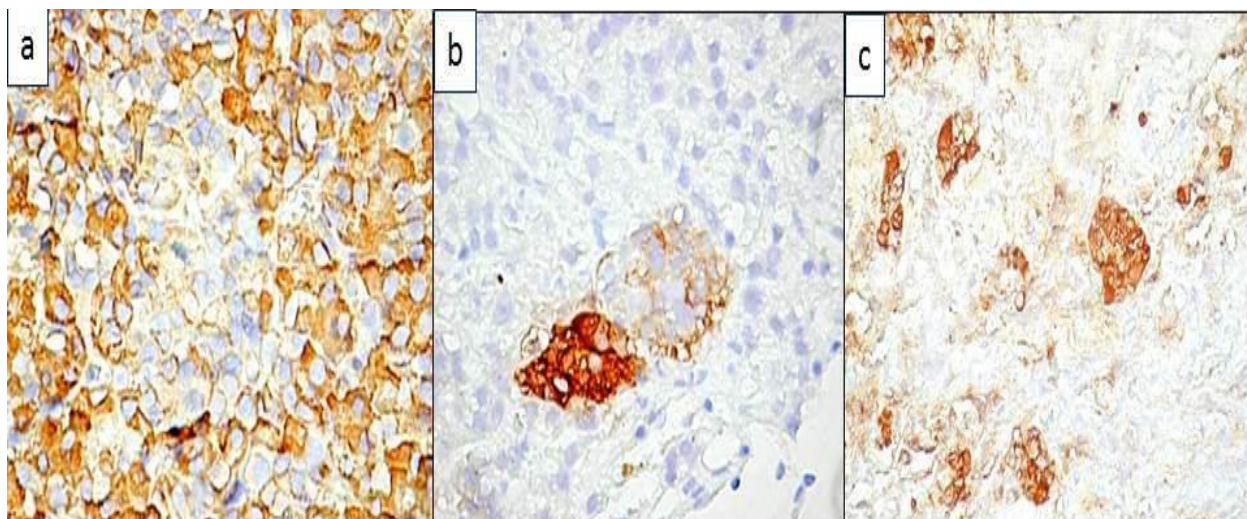


Fig. 3.14. Pattern-ul de distribuție al celulelor GH pozitive (a) TSH secretante (b) și a celor ACTH secretante (c) în tipurile mixte de adenoame hipofizare.

Ca frecvență a urmat asocierea dintre expresia hormonilor FSH și LH. În acest caz ambii hormoni au fost exprimați imunohistochimic cu o intensitate relativ egală, fiind cuantificată în cele mai multe cazuri de astfel de asociere drept moderată și mare (Figura 3.15 a, b).

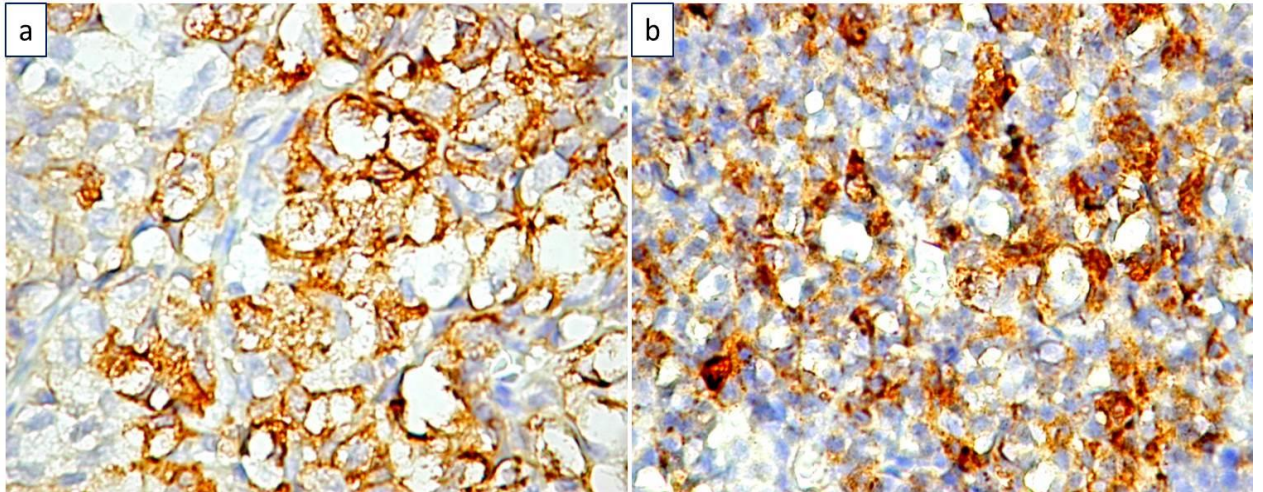


Fig. 3.15. Expresia FSH și LH în tipurile de adenoame hipofizare mixte de tipul FSH-LH

Adenoamele plurihormonale au reprezentat 20% din totalul cazurilor de adenoame hipofizare studiate. Asocierile hormonale au fost foarte eterogene, fiind constituite din trei sau patru tipuri hormonale. Între cazurile studiate nu a predominat un anumit tip de asociere așa cum reiese și din Figura 3.16.

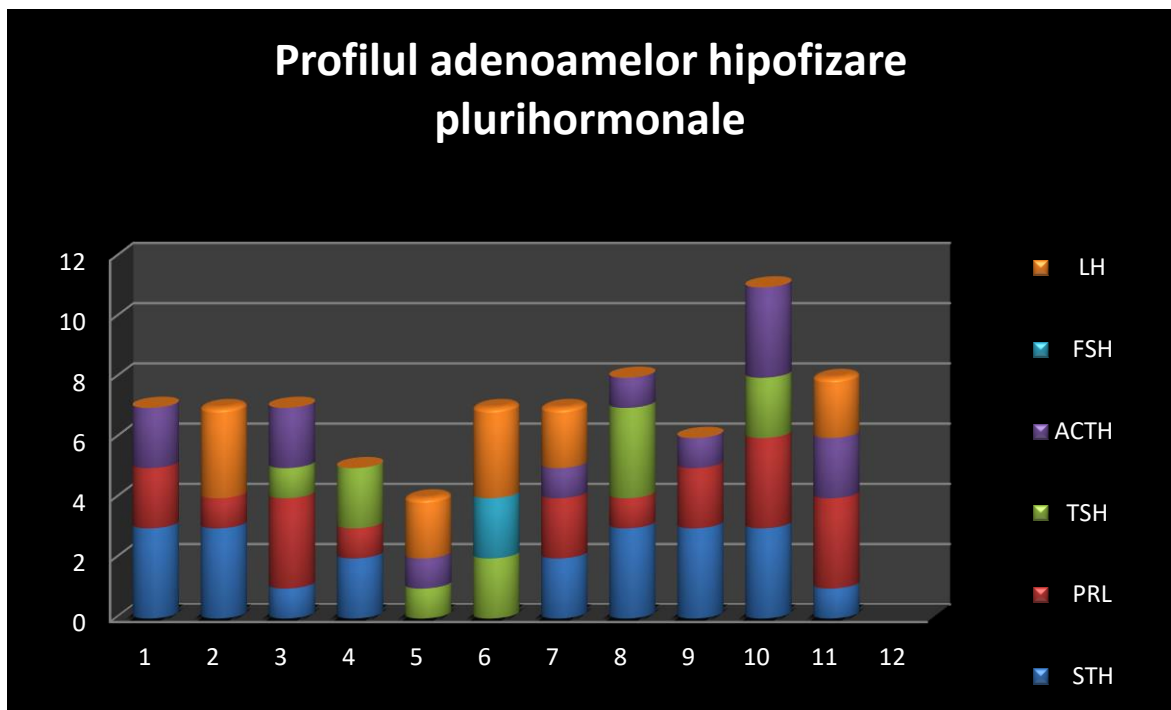


Fig. 3.16. Asocierile plurihormonale întâlnite pentru adenoamele hipofizare care au exprimat imunohistochimic trei sau patru tipuri de hormoni.

De asemenea asocierile triple și cele constituite din 4 tipuri hormonale au fost reprezentate în proporții aproximativ egale. Dintre hormonii exprimați în adenoamele plurihormonale GH și prolactina au prezentat frecvența cea mai crescută, atât GH cât și PRL fiind prezenți în 82% dintre adenoamele plurihormonale. ACTH a fost prezent în 73% din cazuri iar TSH a urmat ca frecvență fiind regăsit imunohistochimic în 54% din adenoamele plurihormonale. Cel mai rar întâlnit hormon în adenoamele plurihormonale a fost FSH, prezent doar în 9% din cazuri. În ceea ce privește intensitatea reacției imunohistochimice, pentru GH și PRL a predominat o expresie intensă și moderată în timp ce, pentru celelalte tipuri hormonale reacția observată a fost slabă sau moderată. De exemplu, pentru TSH a predominat intensitatea moderată în timp ce ACTH a fost caracterizat de o expresie predominant slabă în cadrul asocierilor plurihormonale. Procentul rămas de aproximativ 24% din cazuri au fost adenoame hipofizare nule, care nu au fost pozitive pentru nici un tip de hormon inclus în profilul imunohistochimic al adenoamelor hipofizare.

Discuții. Profilul hormonal al adenoamelor hipofizare este un pas obligatoriu în evaluarea tumorilor hipofizare cu un impact major în diagnosticul și terapia acestora [42]. Practic, în acest moment, nu se mai acceptă ca diagnostic doar evaluarea histopatologică de tip convențional pe preparatele colorate cu metode de rutină. Datele din literatură referitoare la profilul hormonal al adenoamelor hipofizare sunt eterogene, tipurile hormonale descrise prezentând o mare variabilitate procentuală dependentă de numărul de cazuri sau aria geografică de unde provin. Bălinișteanu și colaboratorii, au raportat în 2011 un procent global de aproximativ 60% de adenoame hipofizare pure (secretante a unui singur tip hormonal) din lotul studiat în aria de sud a României [12]. În contrast, studiul nostru a relevat prezența unui procent de aproximativ 34% de adenoame hipofizare monosecretante prin analiza cazurilor din Republica Moldova. Mori și colaboratorii, în 2013 [270] au prezentat date rezultate din studiul unui număr de 242 adenoame hipofizare și au concluzionat că un procent de 45% dintre acestea sunt monohormonale. Un procent relativ similar cu cel găsit în prezentul studiu a fost publicat de Shao și Li care au observat că, 37 % din adenoamele hipofizare sunt monohormonale [286]. Ca o particularitate a studiului nostru și respectiv ca o particularitate a adenoamelor hipofizare monosecretante din Republica Moldova, mai mult de jumătate dintre adenoamele hipofizare monosecretante au fost LH secretante [197]. Celelalte studii au raportat că au predominat adenoamele secretante de GH și PRL, aspect care a fost observat și în studiul din România [203]. Într-adevăr, adenoamele GH secretante au urmat pe cele secretante de LH, fiind urmate de cele PRL pozitive, aspecte care sunt în concordanță cu datele publicate anterior [12, 42, 270]. Adenoamele hipofizare mixte,

caracterizate prin expresia imunohistochimică a doi hormoni hipofizari, au reprezentat un procent de 23% din totalul cazurilor incluse în studiu, în care au predominat asocierile de tip GH-PRL, aspect ce corespunde cu datele din literatură [270]. În prezent, persistă controverse legate de existența acestui tip de asociere în adenoamele hipofizare mixte. Datele din literatură au sugerat faptul că, un adenom hipofizar care inițial era PRL secretant să recidiveze sub forma unui adenom hipofizar GH secretant care a produs simptomatologie clinică specifică acromegaliei. Acest switch a fost explicat parțial prin prezența unei mutații a oncogenei *gsp*, mai concret Arg201His mutation în gena GNAS [170]. Aceste modificări apărute în recidivele adenoamelor hipofizare au un impact major asupra terapiei și prognosticului acestora. Un alt aspect particular și incomplet elucidat în prezent vizează asocierea hormonală de tip GH-TSH. Datele prezente în literatură consideră aceste adenoame hipofizare mixte ca fiind foarte rare, procentul lor variind între 0,5-17% din totalul adenoamelor hipofizare [288]. Procentul de 5% găsit de noi pentru adenoamele hipofizare studiate se încadrează în limitele descrise în literatură. Acest tip de adenoame hipofizare mixte par să aibă un comportament agresiv, fiind caracterizate printr-o invazie crescută și un indice de proliferare ridicat, peste media specifică altor tipuri de adenoame hipofizare, cel mai probabil pe seama TSH [239]. Asocierea GH-ACTH în adenoamele hipofizare este considerată de asemenea o asociere foarte rară, două astfel de cazuri am evaluat în studiul nostru. Date relativ recente din literatură asociază o coexpresie similară cu mutații genice [272]. Evaluarea lor este sporadică în literatură fiind limitată doar la prezentarea unor cazuri clinice și, mult mai rar în cadrul unor studii de cercetare extensivă [6, 162, 193]. Un caz izolat a fost raportat de Zielinski și colaboratorii care au descris un adenom hipofizar GH-ACTH secretant dar, în care componentele GH și ACTH secretante au fost clar delimitate și situate în zone diferite, distincte ale adenohipofizei [350], prin punctarea acestui aspect, autorii sugerând de fapt prezența concomitentă a două tumori distincte la nivelul hipofizei. Asocierea hormonală de tipul PRL-ACTH a fost întâlnită în studiul nostru în 3% din cazuri, fapt care se integrează în cele raportate în literatură [258]. La fel de rară ca și precedentă, această asociere creează impedimente în ceea ce privește instituirea tratamentului corespunzător. Un studiu realizat prin co-cultivarea celulelor PRL secretante și acelor ACTH secretante care au fost tratate succesiv cu factori de tipul CRH sau TRH a demonstrat că stimularea secreției celor doi hormoni nu este echilibrată, aceasta fiind stimulată selectiv și dependent de tipul factorului utilizat. Astfel s-a demonstrat că modul de secreție al PRL în adenoamele mixte de tip PRL/ACTH este diferit și răspunde diferit la terapiile aplicate comparativ cu secreția de PRL din prolactinoamele pure [338]. Majoritatea cazurilor clinice descrise în literatură și caracterizate de asocierea PRL cu

ACTH au fost pacienți cu boala Cushing. În ciuda acestui aspect comun, modalitatea de debut clinic al adenoamelor hipofizare PRL/ACTH secretante a fost extrem de eterogen. Iaccovazzo și colaboratorii [135] au descris un caz al unui pacient de 60 de ani care a dezvoltat inițial un prolactinom, rezolvat prin terapie medicamentoasă, pentru ca ulterior, să prezinte simptome de boală Cushing cu certificarea prezenței unui adenom hipofizar ACTH secretant metacrom. Mittelbronn descrie cazul unui pacient cu simptomatologie clinică de boală Cushing dar cu prezența unui adenom hipofizar cu două componente distincte, PRL și ACTH secretante, certificate histologic și imunohistochimic [210]. Delimitarea clară între zonele PRL și ACTH secretante a fost remarcată de asemenea și pentru cazul nostru. Mai mult, autorii au remarcat o creștere a indicelui de proliferare al celulelor tumorale în zona PRL secretantă comparativ cu cea ACTH pozitivă. Pentru pacienții cu boală Cushing prezența secreției duble de PRL și ACTH are drept bază histologică un adenom corticotrof secretant sau o hiperplazie nodulară cu celule secretante de ACTH asociat unui prolactinom „ silențios ” sau funcțional care determină hiperprolactinemie [210]. Adenoamele hipofizare secretante de FSH și LH au fost de asemenea prezente în studiul nostru. Este bine cunoscut faptul că, acest tip de adenoame hipofizare este extrem de controversat, atât din punct de vedere al simptomatologiei clinice cât și al aspectelor microscopice și imunohistochimice. Majoritatea autorilor clasifică adenoamele hipofizare FSH-LH secretante ca fiind adenoame de tip non funcțional, bazate pe absența imunoreactivității la anticorpii corespondenți. Totuși, alți autori par să fie mai precauți și consideră aceste adenoame hipofizare ca fiind non imunoreactive datorită cantității reduse de antigen care poate fi detectat în celulele adenomatoase [195]. Cazurile pe care le-am identificat în studiul nostru ca fiind FSH-LH secretante au fost în majoritate adenoame hipofizare cu celule cromofobe (cu o singură excepție), iar pattern-ul predominant a fost cel papilar. Intensitatea reacției a fost moderată sau mare, din acest motiv și noi considerăm că termenul de non imunoreactiv este mai corect decât cel de non funcțional. O posibilă explicație a acestor discordanțe de clasificare a adenoamelor hipofizare de tip FSH-LH ca nule sau non imunoreactive este dată de un studiu al lui Horvath și Kovacs care au demonstrat prin microscopie electronică diferențe structurale în celulele adenoamelor gonadotrofe dependente de sexul pacientului [162]. Dacă în cazul celulelor provenite din adenoamele gonadotrofe masculine, organitele celulare erau slab dezvoltate și necaracteristice, similare cu cele din adenoamele hipofizare nule, în celulele adenoamelor hipofizare gonadotrofe feminine au fost evidențiate dilatații veziculare ale complexului Golgi, distincte, în „fagure de miere”, aspect care nu este caracteristic nici unui alt tip de celule din variatele forme de adenoame hipofizare [259]. Ulterior, și alți autori au confirmat aspectul

dicotomic dependent de sex în ceea ce privește modificările structurale din adenoamele hipofizare de tip gonadotrof [124]. Totuși, aceste aspecte rămân încă foarte controversate [158] și incomplet elucidate [276, 277]. Un aspect particular al studiului nostru este determinarea a două asocieri extrem de rar citate în literatură: ACTH-LH și TSH-FSH. Adenoamele hipofizare în care un hormon gonadotrof a fost asociat cu ACTH par să aibă un profil molecular aparte [57] și un comportament clinic particular. Asocierea TSH-FSH a fost raportată în literatură în puține studii datorită rarității adenoamelor hipofizare TSH secretante care reprezintă sub 2% din totalul adenoamelor hipofizare [56]. Asocierea TSH-FSH este și mai rar menționată în literatură, [51, 305] fiind descrisă ca o alianță între subunitatea β a TSH IR și subunitatea β a FSH. Datorită rarității acestei asocieri, nu există în prezent date care să caracterizeze evoluția clinică a pacienților care prezintă astfel de îmbinări. Adenoamele plurihormonale nu au prezentat particularități semnificativ diferite de cele raportate în literatură.

3.3. Concordanță morfologie-imunohistochimie în adenoamele hipofizare

Introducere. Diagnosticul histopatologic convențional al adenoamelor hipofizare tinde să fie, în momentul de față marginalizat, odată cu apariția profilului hormonal bazat pe imunohistochimie. Din acest motiv, corelațiile morfologice-imunohistochimice sunt rar citate în literatură, foarte frecvent fiind menționate doar aspectele imunohistochimice și neglijate particularitățile citologice și ale pattern-ului morfologic de creștere întâlnite în adenoamele hipofizare.

Concordanța morfologie - imunohistochimie reprezintă un parametru util cu valoare orientativă pentru diagnostic. Heterogenitatea hormonilor secretați de adenoamele hipofizare, mai ales în cazul adenoamelor plurihormonale ar putea influența pattern-ul de creștere al acestor tumori.

Sunt foarte bine cunoscute efectele hormonilor secretați de adenohipofiză asupra receptorilor specifici din toate țesuturile organismului uman. În schimb, implicarea hormonilor hipofizari în patogeniza adenoamelor hipofizare, respectiv și acțiunea lor autocrină și paracrină sunt puțin studiate. În prezent, cu excepția prolactinei, care este cunoscută că induce și potențează creșterea și proliferarea celulelor tumorale și a celulelor endoteliale din vasele de neoformație din adenoamele hipofizare, nici un alt hormon nu a fost dovedit că ar influența patternul de creștere al tumorilor hipofizare sau selecția unui anumit tip celular. Incertitudinile care persistă referitor la posibilele corelații dintre aspectele citologice și morfologice acceptate pentru adenoamele hipofizare și profilul lor molecular au reprezentat pentru lucrarea de față o motivație puternică de a sumariza datele rezultate din asocierile morfo-imunohistochimice pe care le-am observat în cadrul prezentului studiu [205].

Rezultate. Caracterele citologice (acidofil, bazofil, cromofob și mixt) precum și pattern-ul de creștere (solid, papilar, trabecular, alveolar, fusiform) au fost corelate cu expresia fiecărui tip de hormon evaluat imunohistochimic. Cazurile au fost inițial grupate în funcție de tinctorialitatea celulelor adenomatoase, indiferent de pattern-ul de creștere a acestora. Corelațiile pe care le-am obținut au fost clasificate ca și corelații totale în cazul în care toți cei trei indici de corelație evaluați (Spearman, Kendal și Pearson) au avut valori statistice semnificative, sau corelații parțiale când am înregistrat un indice de coeziune pentru cel puțin unul din parametrii menționați [196]. Conform programului automat SPSS version 17, de realizare a corelațiilor mai sus menționate, au fost analizați indici cu o valoare semnificativ statistică, coeficienții de corelație $p < 0.01$ pentru corelația de tip Pearson, și un $p < 0.05$ pentru indicii de corelație de tip Kendall și Spearman.

Adenoamele hipofizare acidofile, bazofile, cromofobe și mixte au fost evaluate în raport cu expresia imunohistochimică a hormonilor hipofizari. Adenoamele hipofizare de tip acidofil s-au asociat cu o expresie moderată și crescută a GH evaluate imunohistochimic ca fiind +2 și +3. Pentru adenoamele hipofizare de tip acidofil, am obținut o corelație totală semnificativ statistică pentru toți indicii studiați. Indicele de corelație Pearson a avut o valoarea de $P = 0,002$, similară cu cea pentru indicele de corelație Kendall. Am observat o interdependență mult mai puternică între aspectul acidofil și secreția de STH pentru parametrul de corelație Spearman. Tabelele cu variabilele și corelațiile menționate sunt reprezentate în Figura 3.17.

		Tip acidofil	GH			Tip acidofil	GH	
Tip acidofil	Pearson Correlation	1.000	-.400	Kendall's tau_b	Tip acidofil	Correlation Coefficient	1.000	-.353
						Sig. (2-tailed)		.002
	Sig. (2-tailed)		.002	GH	GH	Correlation Coefficient	-.353	1.000
		N	60			Sig. (2-tailed)		.002
GH	Pearson Correlation	-.400	1.000	Spearman's rho	Tip acidofil	Correlation Coefficient	1.000	-.404
						Sig. (2-tailed)		.001
	Sig. (2-tailed)		.002	GH	GH	Correlation Coefficient	-.404	1.000
		N	60			Sig. (2-tailed)		.001
						N	60	60

Fig. 3.17. Evaluarea statistică a corelației Pearson (a), Kendall și Spearman (b) dintre tipul acidofil și expresia imunohistochimică a GH.

Corelația semnificativ statistică a GH cu tipul acidofil al adenoamelor hipofizare obținută anterior a sugerat existența unor posibile asocieri directe sau inverse între expresia diferitelor tipuri hormonale exprimate în adenoamele hipofizare de tip acidofil. Pentru a putea defini aspectele hormonale în dependență de tipul histopatologic acidofil, am aplicat metodele statistice de corelație pentru GH evaluat în parte cu PRL, TSH, ACTH, FSH și LH.

Analiza expresiei GH în raport cu PRL a evidențiat o corelație directă, parțială semnificativ statistică între GH și PRL pentru tipul acidofil de adenoame hipofizare fiind

înregistrat un $p = 0,032$ pentru indicele Pearson. Valoarea semnificativ statistică a acestei analize a demonstrat faptul că, pentru adenoamele hipofizare de tip acidofil există o suprapunere a expresiei GH și a PRL, ambii hormoni fiind evaluați imunohistochimic cu scor de +2 și +3 în majoritatea cazurilor. Evaluarea GH în raport cu TSH a înregistrat o corelație inversă, semnificativ statistică, toți cei trei parametri având o valoare a $p < 0.034$ (Figura 18a). Un alt aspect particular întâlnit în studiul expresiei hormonilor hipofizari în raport cu tipul histopatologic a fost reprezentat de co expresia PRL cu ceilalți hormoni. Dacă pentru co-expresia GH PRL am obținut doar o corelație parțială, pentru asocierile de tip PRL-ACTH și PRL-FSH corelațiile au fost complete fiind semnificativ statistice pentru un $p = 0.002$ (Figura 3.18b), respectiv $p = 0.040$. Nu s-au observat corelații remarcabile pentru co-expresia PRL cu TSH și nici pentru PRL-LH. În schimb asocierea TSH-ACTH a fost cuantificată cu o semnificație mai mică de 0.01, aceasta fiind marcată de un $p = 0.036$.

		GH	TSH			PRL	ACTH
GH	Pearson Correlation	1.000	.387	PRL	Pearson Correlation	1.000	.751
	Sig. (2-tailed)	.	.034		Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	30	30		N	30	30
TSH	Pearson Correlation	.387	1.000	ACTH	Pearson Correlation	.751	1.000
	Sig. (2-tailed)	.034	.		Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	30	30		N	30	30
a				b			

Fig. 3.18. Evaluarea statistică a corelației Pearson dintre tipul acidofil și co expresia imunohistochimică a GH-TSH respectiv PRL-ACTH.

Varianta cu celule acidofile a adenoamelor hipofizare a potrivit cu expresia imunohistochimică a LH, corelația fiind totală, cu un $p = 0,002$ (Figura 3.19).

		Tip acidofil	LH
Tip acidofil	Pearson Correlation	1.000	.400
	Sig. (2-tailed)	.	.002
	N	60	60
LH	Pearson Correlation	.400	1.000
	Sig. (2-tailed)	.002	.
	N	60	60
a			

		Tip acidofil	LH	
Kendall's tau_b	Tip acidofil	Correlation Coefficient	1.000	.378
		Sig. (2-tailed)	.	.001
		N	60	60
LH		.378	1.000	
		Sig. (2-tailed)	.001	.
		N	60	60
Spearman's rho	Tip acidofil	Correlation Coefficient	1.000	.441
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	60	60
LH		.441	1.000	
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	60	60
b				

Fig. 3.19. Evaluarea statistică a corelației Pearson (a), Kendall și Spearman (b) dintre tipul acidofil și expresia imunohistochimică a LH.

Tipurile bazofil cromofob și mixt nu au corelat semnificativ statistic cu expresia nici una dintre hormonii evaluați imunohistochimic. Cu cea mai mare probabilitate, lipsa corelației dintre aceste tipuri histopatologice și profilul hormonal imunohistochimic s-ar putea datora numărului mic de cazuri înregistrate în aceste categorii.

Evaluarea corelației dintre pattern-ul de creștere asociat profilului hormonal a fost cel de-al doilea obiectiv al concordanței morfologie-imunohistochimie. Dintre pattern-urile de creștere menționate la capitolul de morfologie, s-au putut realiza potriviri pentru tipurile solid, papilar și trabecular. Pentru tipul solid, singurul hormon care a prezentat un grad mic de corelație a fost GH. Acesta s-a corelat parțial cu tipul solid de adenom hipofizar ($p=0.019$ pentru parametrul Kendall, și $p=0.020$ pentru parametrul Spearman (Figura 3.20).

			Tip solid	STH
Kendall's tau_b	Tip solid	Correlation Coefficient	1.000	-.373
		Sig. (2-tailed)	.	.019
		N	30	30
	STH	Correlation Coefficient	-.373	1.000
		Sig. (2-tailed)	.019	.
		N	30	30
Spearman's rho	Tip solid	Correlation Coefficient	1.000	-.421
		Sig. (2-tailed)	.	.020
		N	30	30
	STH	Correlation Coefficient	-.421	1.000
		Sig. (2-tailed)	.020	.
		N	30	30

Fig. 3. 20. Evaluarea statistică a corelației Kendall și Spearman dintre tipul solid și expresia imunohistochimică a GH.

Ceilalți hormoni de asemenea au fost evaluați, dar nu s-a observat nici o corelație semnificativ statistică așa cum rezultă și din valorile p pentru fiecare tip hormonal, respectiv PRL (0.266), TSH (0.478), ACTH (1), TSH (0.383), FSH (0.466) și LH (0.533) Kendall și Spearman dar nu și pentru Pearson. În schimb, analiza îmbinărilor dintre hormonii exprimați în adenoamele hipofizare cu pattern de creștere papilar a relevat predominanța a două asocieri pentru care s-a înregistrat o corelație completă, semnificativ statistică. Pattern-ul de creștere papilar a fost dominat de expresia în tandem, pe de o parte a asocierii GH-PRL pentru care s-a înregistrat o corelație semnificativă certificată de un $p=0.04$ și, pe de altă parte, de asocierea TSH-FSH pentru care p a avut o valoare de 0.01. Nici o altă asociere hormonală nu s-a dovedit a fi specifică pentru tipurile acidofil și papilar de adenoame hipofizare.

3.4. Concluzii la capitolul 3

1. Diagnosticul histopatologic convențional nu trebuie minimalizat în evaluarea adenoamelor hipofizare
2. Profilul morfologic al adenoamelor hipofizare din Republica Moldova a fost dominat de combinațiile de pattern-uri solid acidofil și papilar bazofil.
3. Pattern-ul cromofob a fost mai des întâlnit la cazurile din Republica Moldova comparativ cu statisticile realizate în alte regiuni ale Europei sau în USA.
4. Lipsa corelațiilor dintre profilul morfologic și indicele de proliferare sau expresia factorilor de creștere și a receptorilor corespondenți a redus impactul morfologiei convenționale asupra factorilor de prognostic și terapie.
5. Rata adenoamelor hipofizare pure în lotul studiat în Republica Moldova a fost mai mic decât cel întâlnit și raportat în România (34% versus 60%)
6. Dintre acestea, au predominat adenoamele hipofizare pure LH secretante, acestea fiind observate în peste 50% din cazurile de adenoame hipofizare pure.
7. Din punct de vedere al profilului hormonal imunohistochimic, lotul de studiu a fost extreme de eterogen
8. Au fost descrise și caracterizate asocieri hormonale extrem de rar întâlnite în patologie.
9. În cadrul asocierilor hormonale a fost identificat pattern-ul de expresie imunohistochimică și distribuție a reacției pozitive a diferitelor tipuri de hormoni
10. Am remarcat o expresie crescută a TSH în adenoamele hipofizare studiate, dar într-un singur caz această expresie nu a fost asociată cu expresia altor tipuri de hormoni, majoritatea cazurilor în care am remarcat TSH pozitiv fiind mixte sau plurihormonale.
11. Rata cazurilor de adenoame hipofizare mixte cu asocieri rare a fost superioară mediei întâlnite în literatură de specialitate. Acest aspect susține prezența unor factor etiopatogenici particulari zonei de unde provin adenoamele hipofizare.
12. Majoritatea cazurilor cu profil hormonal rar nu au fost caracterizate până în prezent din punct de vedere clinico-patologic și, acest fapt reprezintă scopul continuării cercetărilor în domeniul patologiei hipofizare particularizat pentru Republica Moldova.

4. FACTORII PREDICTIVI PENTRU DIAGNOSTICUL ȘI TERAPIA ADENOAMELOR HIPOFIZARE

4.1. Rata de proliferare a adenoamelor hipofizare

Adenoamele hipofizare pot crește fie prin expansiune, fie prin invazia structurilor adiacente. În primul caz, tumorile sunt mici, bine delimitate și restricționate în șaua turcească. Adenoamele invazive au de obicei o creștere rapidă, invadând țesuturile vecine ca: sinusul sfenoid, sinusul cavernos și în unele cazuri chiar țesutul cerebral.

Mecanismul invaziv al acestor adenoame agresive nu este încă înțeles pe deplin. Proliferarea continuă de la adenom la adenom invaziv și carcinom nu a fost demonstrată în marea majoritate a tumorilor. Tendința de infiltrare locală a adenoamelor hipofizare și invazia țesuturilor adiacente pare a nu se corela cu aspectele histologice ale tumorii. Adenoamele invazive nu trebuie să prezinte neapărat aspecte histologice de agresivitate incluzând pleomorfismul, atipia nucleară și activitate mitotică. În pofida faptului că adenoamele funcționale și cele nefuncționale se pot prezenta ca tumori invazive, s-a observat că cele funcționale au această proprietate mult mai des.

Studierea activității proliferative a adenoamelor a fost utilizată pentru a discerne adenoamele agresive de cele indolente. Aceste studii au arătat că majoritatea tumorilor prezintă un indice de proliferare sub 3%. Adenoamele clinic funcționale prezintă o proliferare mult mai mare decât cele nefuncționale. Există o puternică corelație între expresia Ki67 (MIB-1) și capacitatea de invazie a adenoamelor, însă nu s-a demonstrat încă o corelație între indexul proliferativ și recurența acestora. Tumorile care prezintă o activitate mitotică crescută și/sau un indice Ki67 crescut trebuie să fie desemnate ca adenoame atipice, iar pacienții trebuie urmăriți cu atenție. Adenoamele pituitare sunt tumori cu o rată de creștere variabilă, și cu un potențial de invazie și recurență variabil. Unele tumori cresc rapid, altele rămân în stare dormantă mult timp. Rata de recurență este de asemenea greu de prezis, adenoame hipofizare care inițial erau cu rată de proliferare redusă, achiziționează un ritm de proliferare rapid, și produc recidive agresive. Capacitatea de predicție a potențialului proliferativ al adenoamelor hipofizare ar putea avea implicații majore în managementul clinic al adenoamelor hipofizare. Literatura de specialitate a fost axată pe identificarea factorilor predictivi de comportament al adenoamelor hipofizare. Indexul de proliferare Ki67 a fost demonstrat ca fiind o unealtă utilă în măsurarea proliferării tisulare și, din acest motiv, a fost studiat extensiv.

În adenoamele hipofizare, indicele de proliferare pentru Ki67 a fost remarcat ca fiind crescut în cazurile cu recurențe. Nu sunt date precise despre implicarea hormonilor hipofizari în determinarea ratei de proliferare și a factorilor de creștere în adenoamele hipofizare. Din acest motiv, scopul studiului de față a fost de a identifica rolul potențial al hormonilor hipofizari precum și a factorilor de creștere, GFAP și proteinei S100 în influențarea ratei de proliferare a adenoamelor hipofizare. Adenoamele hipofizare proliferante au reprezentat un procent de 73% din totalul cazurilor incluse în studiu. Expresia Ki 67 a fost restricționată nuclear, intensitatea reacției fiind variabilă, în cele mai multe cazuri moderată și intensă. Rata de proliferare a fost extrem de heterogenă în cadrul grupului, variind între 4/1000 și 49/1000 (Figura 4.1 a, b).

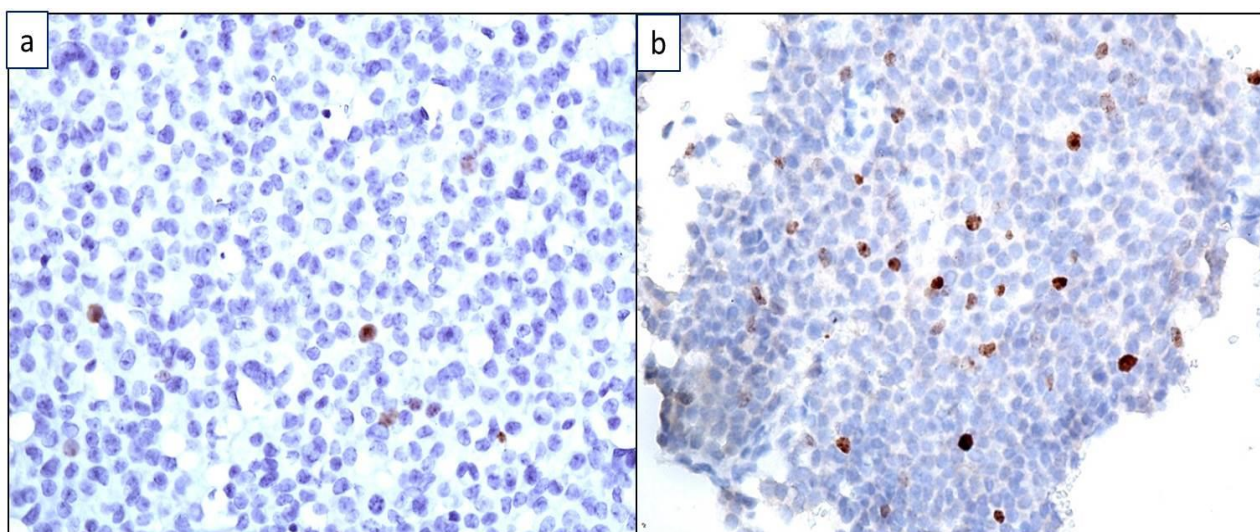


Fig. 4.1. Variabilitatea ratei de proliferare a adenoamelor hipofizare. Adenoame hipofizare cu rată de proliferare scăzută (a) și rată de proliferare mare (b).

Cea mai înaltă rată de proliferare a fost înregistrată în adenoamele de tip acidofil sau în ariile cu celule acidofile din cadrul adenoamelor hipofizare mixte. Adenoamele hipofizare de tip cromofob au fost negative pentru Ki67 în proporție de 90%, la fel ca și cele care au prezentat celule bazofile [200]. Raportat la pattern-ul de creștere, adenoamele hipofizare de tip papilar au fost cel mai frecvent proliferante, rata de proliferare fiind, în majoritatea cazurilor mai mare de 20/1000. Adenoamele hipofizare cu pattern de creștere trabecular au prezentat cea mai mică rată de proliferare, în aproximativ 50% din cazuri aceasta fiind zero. Adenoamele hipofizare cu pattern de creștere compact au avut un indice mediu de proliferare, fiind situate între cele de tip papilar și trabecular [13].

Ulterior, am analizat rata de proliferare a adenoamelor hipofizare în raport cu profilul

hormonal al acestora. Dintre adenoamele hipofizare plurihormonale, 50% nu au prezentat proliferare, indicele de proliferare fiind notat cu 0. Celelalte adenoame de tip plurihormonal au avut un indice de proliferare înălțat, 83,33% dintre ele fiind caracterizate printr-un indice de proliferare cuprins între 21-41/1000. Adenoamele hipofizare pure, care au exprimat imunohistochimic doar un singur tip de hormon au fost proliferante într-un procent de 59% din cazuri, 41% fiind neproliferante. Aproximativ 80% dintre adenoamele hipofizare GH secretante au fost proliferante, cu o rată de proliferare medie, cuprinsă între 13-24/1000. În cazul adenoamelor hipofizare mixte de tip GH-PRL, 77,7% din cazuri au proliferat cu o rată de proliferare cuprinsă între 5-29/1000. Toate cazurile FSH-LH pozitive au fost proliferante, dar rata de proliferare a fost relativ scăzută, în 60% din cazuri aceasta fiind cuprinsă între 6-12/1000. Adenoamele hipofizare non-secretante au fost proliferante într-o proporție de 77,8% din cazuri. Dintre cazurile proliferante, 57,14% au avut o rata medie, cuprinsă între 11-20/1000. În studiul de față am identificat și alte asocieri hormonale, altele decât cele precizate anterior. Numărul lor a fost redus astfel că, aceste tipuri particulare, au necesitat o analiză separată.

Astfel, asocierea hormonală PRL-ACTH a fost întâlnită într-un singur caz de adenom papilar predominant bazofil cu zone acidofile unde rata de proliferare a fost foarte mare, respectiv 30/1000. Un alt caz izolat cu profil hormonal GH-TSH a prezentat de asemenea o rată relativ mare de proliferare de 20/1000. În schimb, în majoritatea asocierilor de profil hormonal în care unul dintre hormoni a fost LH, rata de proliferare a celulelor tumorale a fost 0. De fapt, LH a fost singurul hormon pentru care am obișnuit o corelație inversă semnificativ statistică cu indicele de proliferare Ki67 așa cum rezultă din tabelul de corelație prezentat în Figura 4.2.

		Ki 67	LH			Ki 67	LH	
		1.000	-.247	Kendall's tau_b	Ki 67	Correlation Coefficient	1.000	-.206
		.	.027			Sig. (1-tailed)	.	.023
		61	61			N	61	61
Ki67	Pearson Correlation	1.000	-.247		LH	Correlation Coefficient	-.206	1.000
	Sig. (1-tailed)	.	.027			Sig. (1-tailed)	.023	.
	N	61	61			N	61	61
LH	Pearson Correlation	-.247	1.000	Spearman's rho	Ki 67	Correlation Coefficient	1.000	-.265
	Sig. (1-tailed)	.027	.			Sig. (1-tailed)	.	.020
	N	61	61			N	61	61
					LH	Correlation Coefficient	-.265	1.000
						Sig. (1-tailed)	.020	.
						N	61	61

Fig.4. 2. Analiza statistică a corelației dintre indicele de proliferare Ki67 și LH. De remarcat o corelație inversă între expresia LH și rata de proliferare.

Testul ANOVA (Figura 4.3) a relevat de asemenea o implicare directă și a TSH și ACTH în influențarea ratei de proliferare dar, datorită numărului mic de cazuri ce exprimă un astfel de profil hormonal, corelațiile de tip Pearson, Kendall și Spearman nu au putut fi realizate.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GH	Between Groups	32.465	26	1.249	.566	.931
	Within Groups	74.944	34	2.204		
	Total	107.410	60			
PRL	Between Groups	41.368	26	1.591	1.753	.062
	Within Groups	30.861	34	.908		
	Total	72.230	60			
TSH	Between Groups	16.138	26	.621	1.245	.271
	Within Groups	16.944	34	.498		
	Total	33.082	60			
ACTH	Between Groups	32.383	26	1.245	2.049	.025
	Within Groups	20.667	34	.608		
	Total	53.049	60			
FSH	Between Groups	20.553	26	.791	2.028	.027
	Within Groups	13.250	34	.390		
	Total	33.803	60			
LH	Between Groups	20.907	26	.804	.396	.992
	Within Groups	69.028	34	2.030		
	Total	89.934	60			
Proteina S100	Between Groups	16.049	26	.617	.839	.674
	Within Groups	25.000	34	.735		
	Total	41.049	60			
GFAP	Between Groups	22.739	26	.875	.738	.786
	Within Groups	40.278	34	1.185		
	Total	63.016	60			
HER2	Between Groups	30.833	26	1.186	.893	.613
	Within Groups	45.167	34	1.328		
	Total	76.000	60			
EGFR	Between Groups	45.090	26	1.734	.985	.510
	Within Groups	59.861	34	1.761		
	Total	104.951	60			
VEGF	Between Groups	42.926	26	1.651	1.005	.488
	Within Groups	55.861	34	1.643		
	Total	98.787	60			
PDGF A	Between Groups	27.784	26	1.069	.636	.882
	Within Groups	57.167	34	1.681		
	Total	84.951	60			
PDGF B	Between Groups	43.976	26	1.691	1.229	.283
	Within Groups	46.778	34	1.376		
	Total	90.754	60			

Fig. 4.3. Testul ANOVA, implicarea directă a TSH și ACTH în rata de proliferare

4.2. Expresia GFAP și a proteinei S100 în adenoamele hipofizare cu implicații în prognostic și terapie

Expresia GFAP a fost cuantificată imunohistochimic în hipofiza normală și în adenoamele hipofizare. S-a demonstrat astfel o heterogenitate în expresie a GFAP corelată cu tipul celular și distribuția sa. Inițial, s-a descris expresia GFAP în hipofiza normală. Ca pattern de expresie, am întâlnit distribuția citoplasmatică a GFAP și citoplasmatică combinată cu cea membranară în celulele endocrine (normale și tumorale) și celulele folicular stelate (FS) (Figura 4.4.a, b, c).

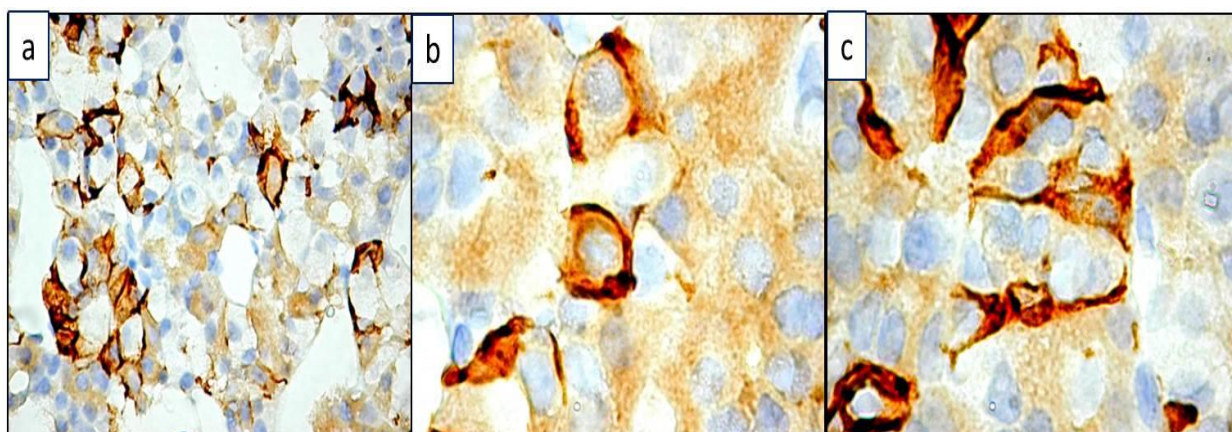


Fig. 4.4. Pattern-ul de expresie al GFAP în hipofiza normală. Heterogenitate de expresie între cuiburile de celule endocrine (a), urmat de pattern de expresie citoplasmatic sau, combinat citoplasmatic și membranar (b). În celulele folicular stelate (FS), expresia a fost intensă și omogenă (c).

În țesutul hipofizar normal, GFAP a fost exprimat heterogen, fiind pozitiv atât în celulele folicular stelate cât și în celulele endocrine. Astfel, în celulele de tip acidofil, cel mai probabil secretante de GH, GFAP s-a exprimat cu o intensitate slabă în citoplasmă, intensificarea membranară fiind observată foarte rar. Printre aceste tipuri celulare, am observat inserate celule intens pozitive, cu morfologie de tip cromofob sau bazofil. FS au fost distribuite printre celulele endocrine dar și în jurul vaselor capilare și au avut o morfologie aparte cu prelungiri rare și scurte ce au fost strâns apoziționate pe peretele vasului capilar.

Celulele FS au fost distribuite discontinuu în jurul vaselor capilare fenestrate, contactul dintre acestea și peretele capilar fiind realizat doar prin intermediul prelungirilor celulelor FS (Figura 4. 5). Densitatea celulelor FS a fost relativ scăzută, fiind observate 2-4 celule/vas capilar.

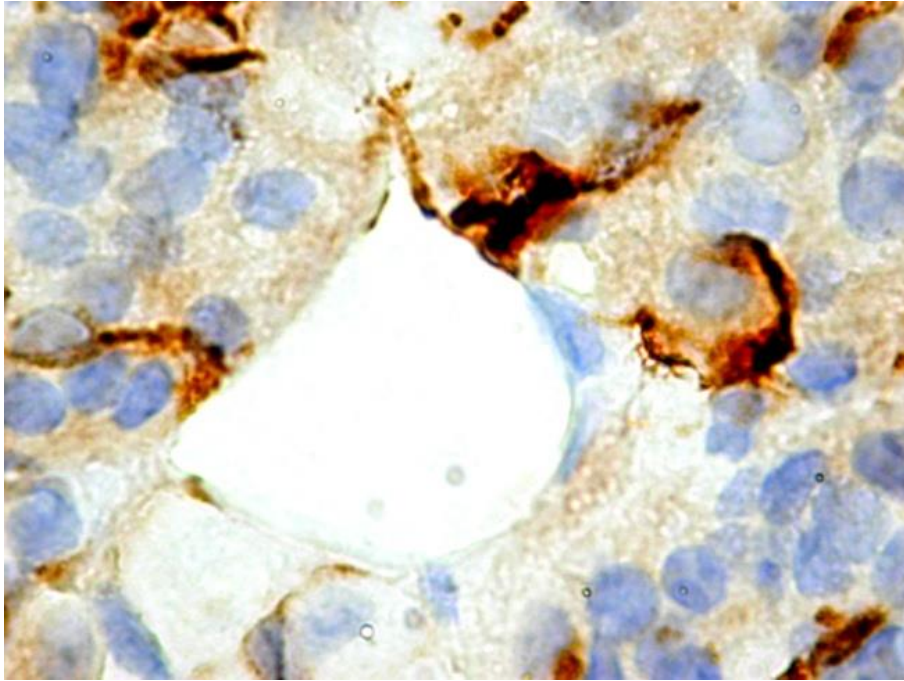


Fig. 4.5. Celule foliculostelate în jurul vaselor capilare, cu prelungirile atașate peretelui vasului sanguin. De remarcat densitatea relativ scăzută a celulelor FS pe circumferința vasului capilar.

Un aspect particular a fost observat în zona de hipofiză intermediară unde celulele care au delimitat structurile pseudofoliculare au fost intens pozitive pentru GFAP (Figura 4.6).

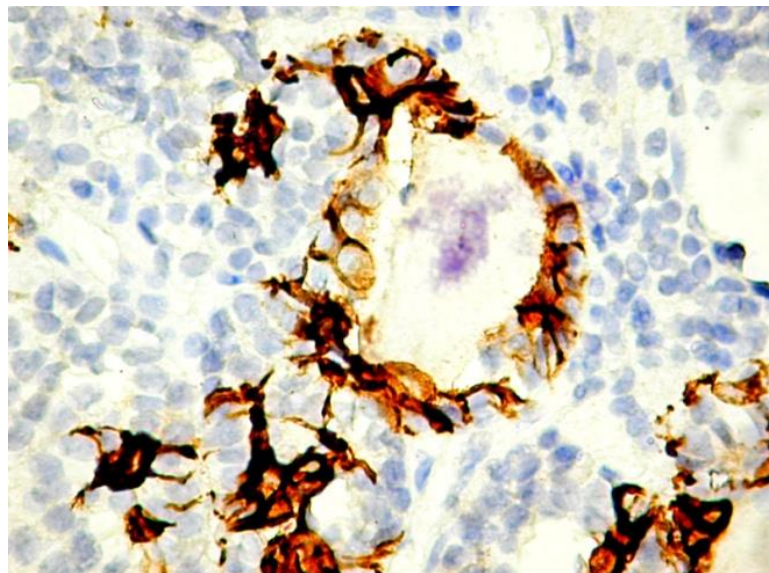


Fig. 4.6. Structuri pseudofoliculare delimitate de celule GFAP pozitive, împreună cu celule folicular stelate care sunt distribuite în jurul structurilor pseudofoliculare din partea intermediară a hipofizei.

Adenoamele hipofizare s-au caracterizat printr-o expresie crescută a GFAP, cu o localizare similară celei din hipofiza normală, respectiv în celulele endocrine tumorale și celulele FS.

Din totalul cazurilor incluse în studiu, 43,33% au fost pozitive la GFAP. În toate cazurile celulele tumorale au prezentat o expresie slabă sau moderată cu localizare strict citoplasmatică (Figura 4.4a). În schimb celulele FS au avut o reacție de intensitate similară celor din hipofiza normală dar, densitatea lor a fost net superioară celei din țesutul hipofizar normal (Figura 4.7b).

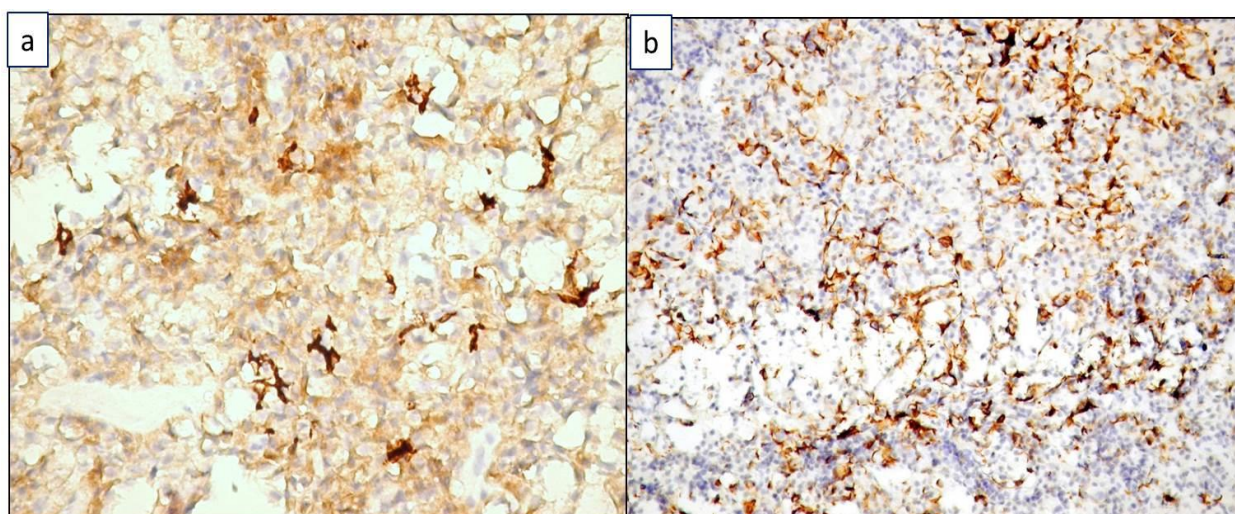


Fig. 4.7. Celule tumorale GFAP pozitive cu intensitate redusă și moderată printre care se observă celule folicular stelate intens pozitive la GFAP (a) într-un adenom hipofizar GH secretant.

Densitate crescută de celule FS, GFAP pozitive într-un adenom hipofizar secretant de LH(b).

Mai mult, distribuția celulelor FS, GFAP pozitive a fost dependentă de profilul hormonal al adenoamelor incluse în studiu. Astfel, în adenoamele cu un profil de tip GH sau combinat GH-PRL, celulele FS au avut o densitate scăzută, fiind inserate printre celulele tumorale slab sau moderat pozitive pentru același marker (Figura 4a). În schimb, în adenoamele cromofobe, celulele tumorale au fost negative pentru GFAP, intensitatea și densitatea celulelor FS- GFAP+ fiind crescute. Același aspect s-a remarcat și în cazul adenoamelor hipofizare cu celule bazofile care au fost de asemenea negative pentru GFAP. În adenoamele hipofizare de tip mixt, acidofil-bazofil ca și în cel cromofob bazofil, se păstrează pattern-ul de expresie legat de tipul celular așa cum se observă, comparativ și în Figura 4.8.

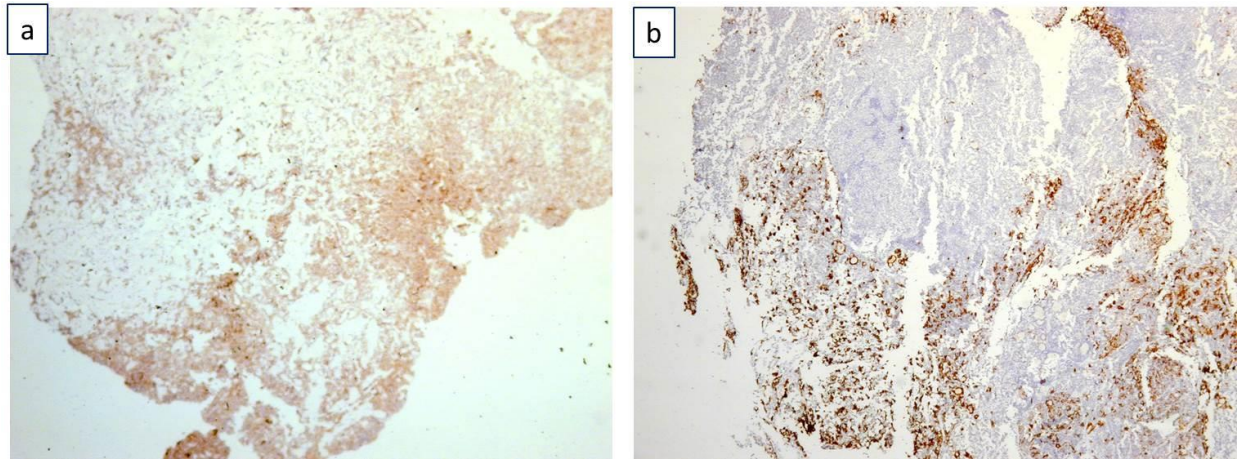


Fig. 4.8. Distribuția heterogenă a expresiei GFAP în celulele tumorale din adenoamele hipofizare mixte acidofil-bazofile (a, cu GFAP+ în celulele acidofile și negativ în cele bazofile) și bazofil cromofob (b, pozitiv în componenta cromofobă).

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. Distribuția acestora a fost de asemenea specifică, în sens că au fost grupate în jurul vaselor sanguine, cu tendința de a forma un strat relativ continuu în jurul vaselor capilare (Figura 4.9a). Adenoamele hipofizare ACTH secretante au prezentat, o serie de spații vasculare, aparent nedelimitate de celulele endoteliale, cu peretele format din celule tumorale și celule FS dispuse în palisadă în jurul spațiului pseudovasculare (Figura 4.9b).

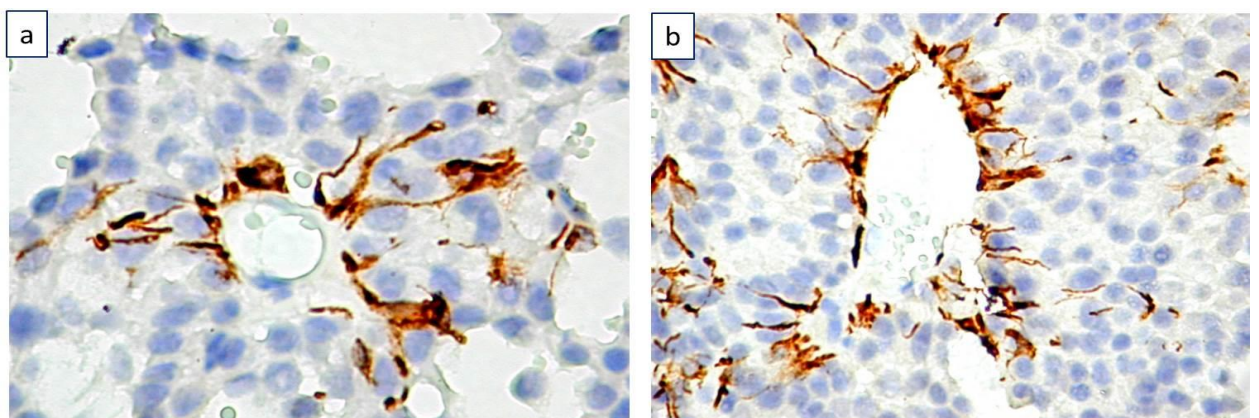


Fig.4.9. Celule FS cu distribuție perivasculară (a) și cu tendința de a forma, împreună cu celulele tumorale peretele ce delimitează spațiile pseudo vasculare, caracteristice adenoamelor hipofizare ACTH secretante (b).

Adenoamele hipofizare de tip bazofil au fost de asemenea în majoritate negative pentru GFAP în celulele tumorale, dar am observat celule FS cu densitate crescută de asemenea în jurul vaselor sanguine. Spre deosebire de distribuția din adenoamele ACTH secretante, în adenoamele de tip bazofil, stratul de celule FS a fost discontinuu (Figura 4.10) fiind grupate la periferia adenoamelor hipofizare de tip bazofil sau distribuite în grupuri mici, compacte în interiorul ariilor tumorale (Figura 4.11 a, b).

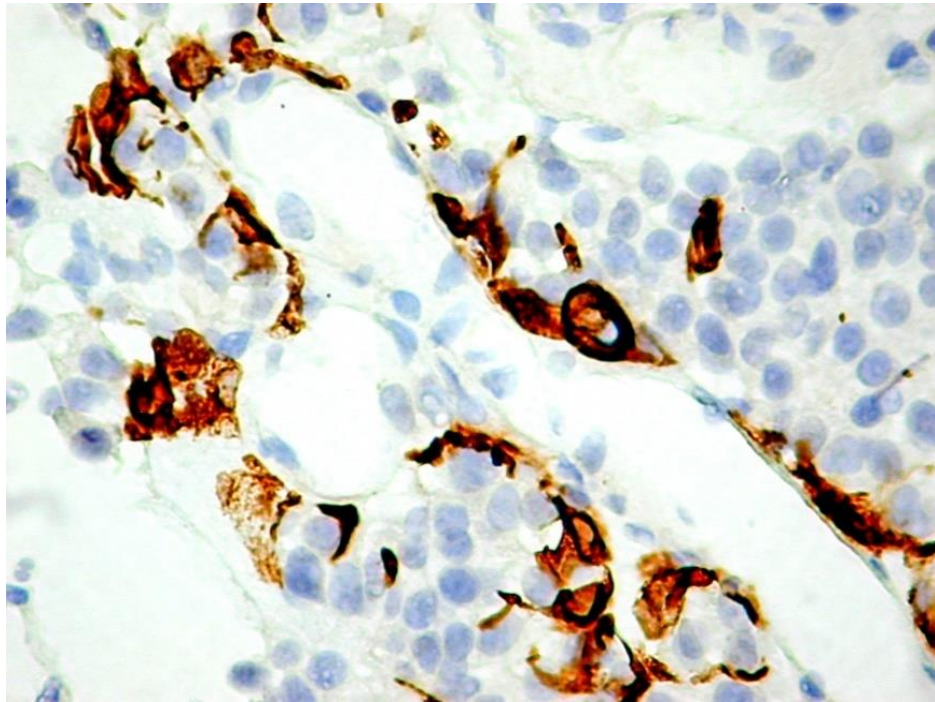


Figura 4.10. Vas dintr-un adenom hipofizar de tip bazofil cu strat discontinuu de celule FS.

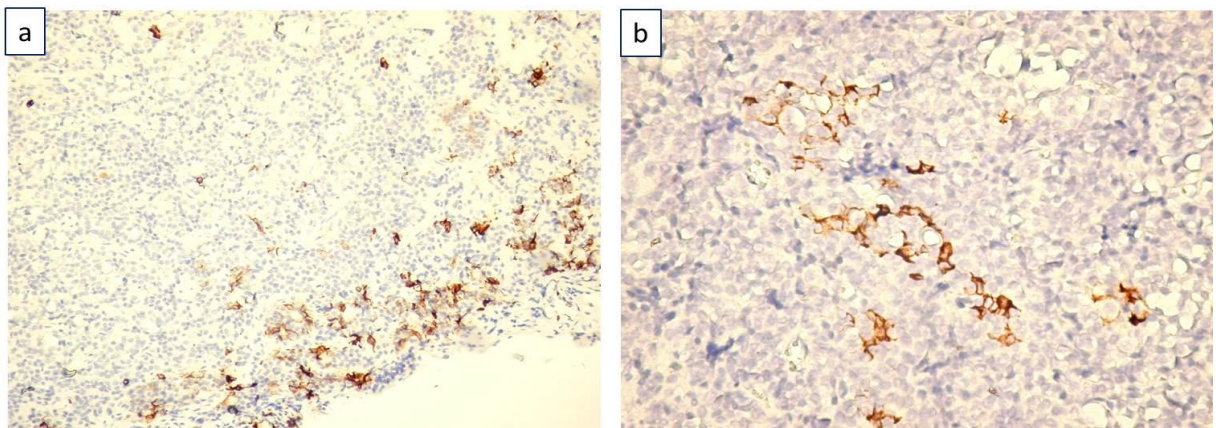


Figura 4.11. Aglomerare periferică de celule FS-GFAP+ la periferia adenoamelor hipofizare cu celule bazofile (a) și gruparea lor în interiorul ariilor tumorale (b)

Cea mai mare densitate de celule FS-GFAP+ a fost remarcată în adenoamele hipofizare plurihormonale, predominant în tipul papilar. Celulele FS-GFAP+ au format în acest caz o rețea foarte bine organizată prin interrelația pe care au realizat-o cu ajutorul prelungirilor citoplasmaticice (Figura 4.12a). În anumite zone, interacțiunea dintre celulele FS-GFAP+ și vasele capilare a fost întreruptă prin interpunerea de celule tumorale între cele două structuri histologice (Figura 4.12b).

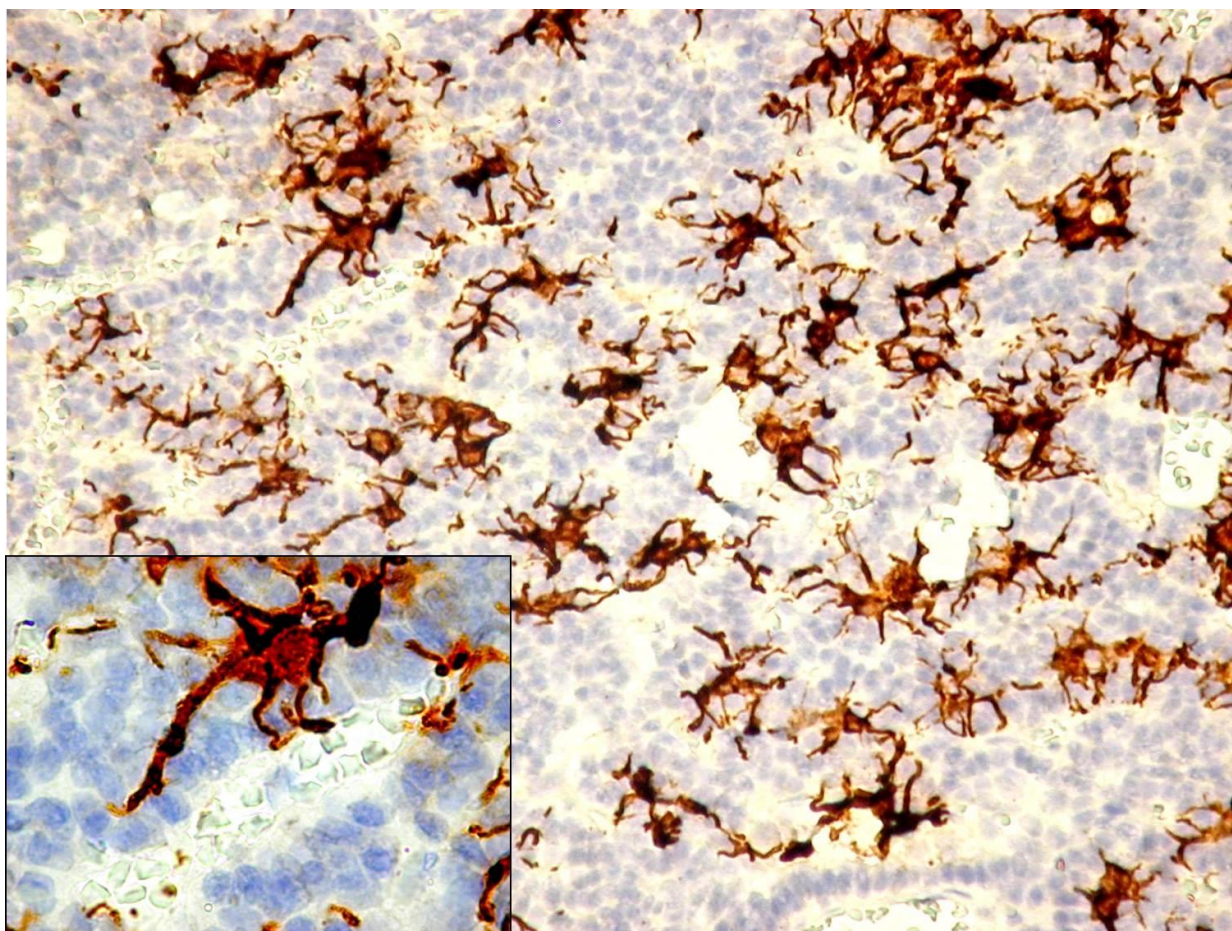


Fig. 4.12. Distribuția celulelor FS-GFAP+ în adenoamele hipofizare plurihormonale. De remarcat densitatea crescută și dispoziția sub formă de rețea dată de interconexiunile dintre prelungirile numeroase ale celulelor FS-GFAP+. Interpunere de celule tumorale între prelungirile celulelor FS-GFAP+ și peretele vasului capilar ce sugerează disrupția barierei hematoencefalice.

Observația celulelor FS-GFAP+ în țesutul hipofizar normal și în adenoamele hipofizare a relevat o eterogenitate morfologică dependentă nu doar de statusul normal sau adenomatos dar și de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare.

Astfel, în țesutul hipofizar normal, celulele FS-GFAP+ au avut un corp celular alungit și

au prezentat prelungiri scurte și rare, interpușe printre celulele endocrine sau atașate peretelui capilar (Figura 4.13a). În adenoamele hipofizare GH secretante, celulele FS-GFAP+ au prezentat un corp neregulat, de cele mai multe ori cu aspect triunghiular, cu prelungiri scurte, strâns apoziționate pe celulele tumorale adenomatoase (Figura 4.13b).

Celulele perivasculare din adenoamele ACTH secretante au avut un corp celular ovalar, alungit, inserat printre celulele tumorale, cu dispoziție caracteristică „în palisadă” și tendința de a emite prelungiri doar de la polul celular opus lumenului vascular sau pseudovascular.

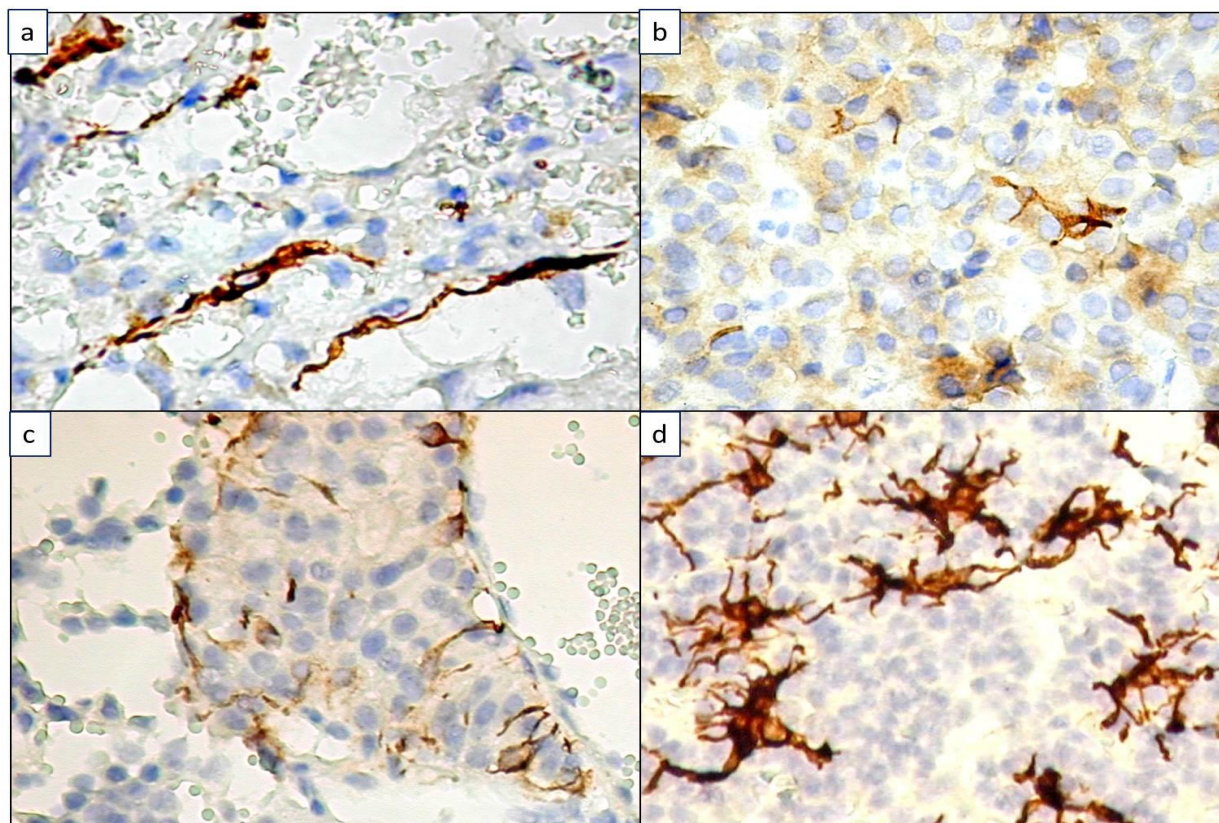


Fig. 4.13. Heterogenitatea morfologică a celulelor FS-GFAP+ în hipofiza normală (A), adenoame hipofizare GH secretante (b), ACTH secretante (c) și FSH/LH secretante (d)

Pornind de la observația microscopică a eterogenității morfologice a celulelor FS-GFAP+, am continuat studiul prin investigarea corelației dintre expresia GFAP și profilul hormonal al adenoamelor hipofizare, cu scopul de a identifica potențialele influențe ale hormonilor hipofizari asupra dinamicii celulelor FS-GFAP+.

Dintre toți hormonii hipofizari, expresia GH a prezentat o corelație semnificativă, dar slabă cu expresia GFAP ($p=0,055$ pentru indicele Pearson) dar semnificativă pentru indicii Kendall și Spearman (Figura 4.14).

		GH	GFAP			GH	GFAP		
GH	Pearson Correlation	1.000	.207	Kendall's tau_b	GH	Correlation Coefficient	1.000	.194	
	Sig. (1-tailed)	.	.055				Sig. (1-tailed)	.	.046
	N	61	61				N	61	61
GFAP	Pearson Correlation	.207	1.000	Spearman's rho	GH	Correlation Coefficient	1.000	.218	
	Sig. (1-tailed)	.055	.				Sig. (1-tailed)	.	.046
	N	61	61				N	61	61
					GFAP	Correlation Coefficient	.194	1.000	
						Sig. (1-tailed)	.046	.	
						N	61	61	
					GFAP	Correlation Coefficient	.218	1.000	
						Sig. (1-tailed)	.046	.	
						N	61	61	

Fig. 4.14. Evaluarea statistică a corelației Pearson în comparație cu evaluarea Kendal și Spearman ale adenoamelor GH secretante și coexpresia GFAP

O corelație puternică a înregistrat și expresia ACTH în raport cu GFAP, astfel că indicele de corelație a fost semnificativ statistic cum rezultă și din Figura 4.15 (a, b). O corelație slabă a fost prezentă și în ceea ce privește LH (Figura 4.15c).

		GFAP	ACTH			GFAP	ACTH		
GFAP	Pearson Correlation	1.000	.276	Kendall's tau_b	GFAP	Correlation Coefficient	1.000	.296	
	Sig. (2-tailed)	.	.031				Sig. (2-tailed)	.	.012
	N	61	61				N	61	61
ACTH	Pearson Correlation	.276	1.000	Spearman's rho	GFAP	Correlation Coefficient	1.000	.325	
	Sig. (2-tailed)	.031	.				Sig. (2-tailed)	.	.011
	N	61	61				N	61	61
LH	Pearson Correlation	.203	1.000	Spearman's rho	ACTH	Correlation Coefficient	.325	1.000	
	Sig. (1-tailed)	.058	.				Sig. (2-tailed)	.011	.
	N	61	61				N	61	61

Fig. 4.15. Evaluarea statistică a expresării ACTH și GFAP în adenoame LH și ACTH secretante

Dintre ceilalți markeri moleculari incluși în studiu, am înregistrat o corelație inversă între expresia GFAP și a oncoproteinei HER2 ($p=0,025$). Supraexpresia EGFR nu a fost semnificativ statistic suprapusă peste expresia GFAP ($p=0,072$). În schimb, am înregistrat o foarte puternică corelație între GFAP și supraexpresia VEGF în adenoamele hipofizare, cu un $p=0,0014$.

Proteina S100 în adenoamele hipofizare a fost studiată tot prin metoda imunohistochimică pe hipofiza normală și adenoamele hipofizare. Proteina S100 s-a demonstrat a avea un pattern nuclear și citoplasmatic, fiind pozitivă în celulele folicular stelate dar și în celulele endocrine ale hipofizei normale (Figura 4.16) și adenomatoase.

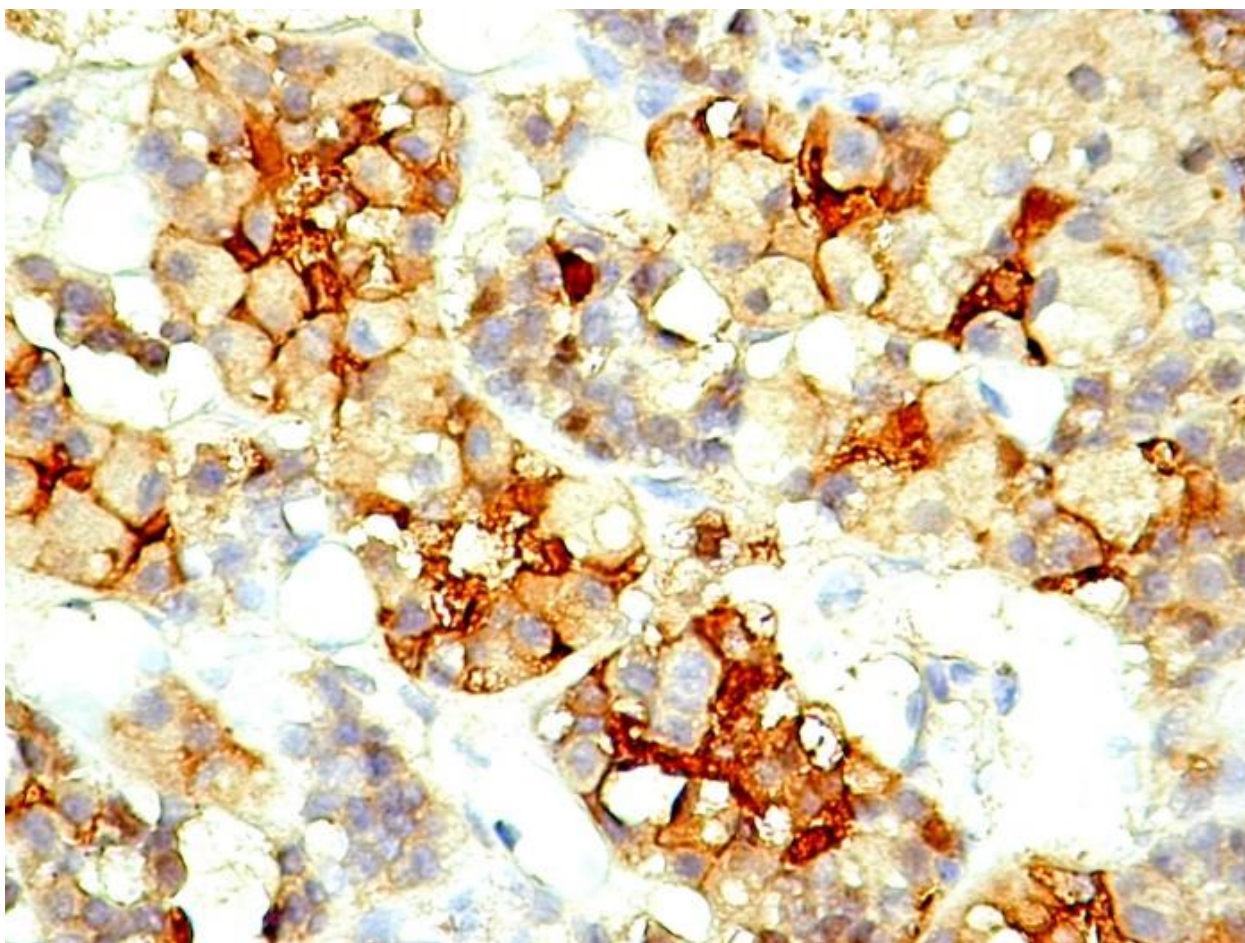


Fig. 4.16. Expresia proteinei S100 în hipofiza normală. Se remarcă expresie intensă, nucleară și citoplasmatică în celulele folicular stelate și expresie moderată restricționată citoplasmatic în celulele endocrine cu pattern acidofil pe HE și intensitate slabă în celulele cromofobe.

Pattern-ul combinat, nuclear/citoplasmatic a fost observat în celulele tumorale la doar 19,5% din cazurile pozitive la proteina S100 (Figura 4.17a), restul cazurilor având o expresie restricționată citoplasmatic (Figura 4.17b).

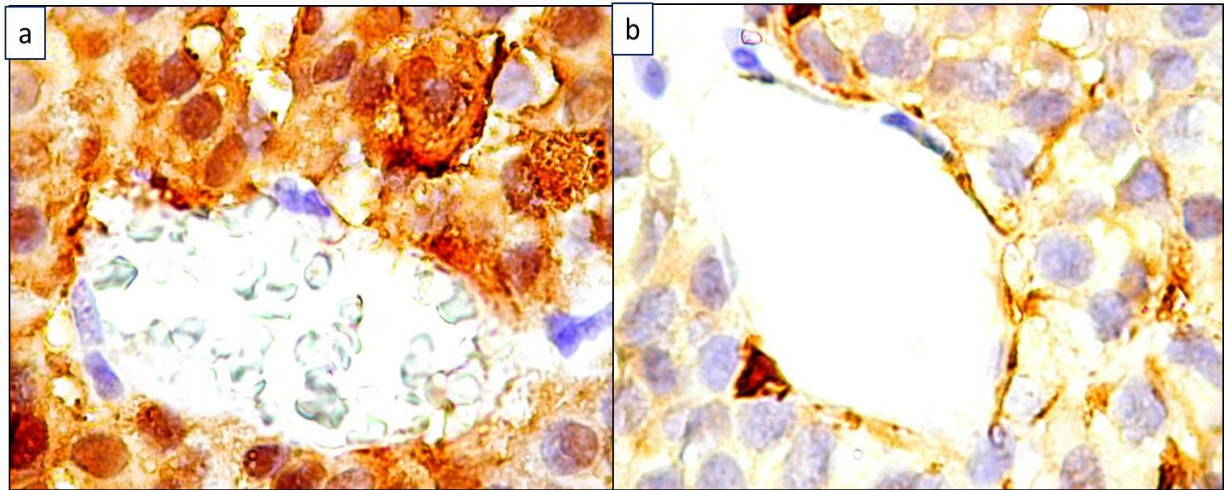


Fig.4.17a. Celulele tumorale S100+, cu pattern combinat, nuclear și citoplasmatic

Fig.4.17b. Celulele tumorale S100+, cu pattern citoplasmatic.

Atât în hipofiza normală cât și în adenoamele hipofizare, ocazional au fost observate celulele endoteliale cu expresie nucleară a S100 (Figura 4.18 a, b).

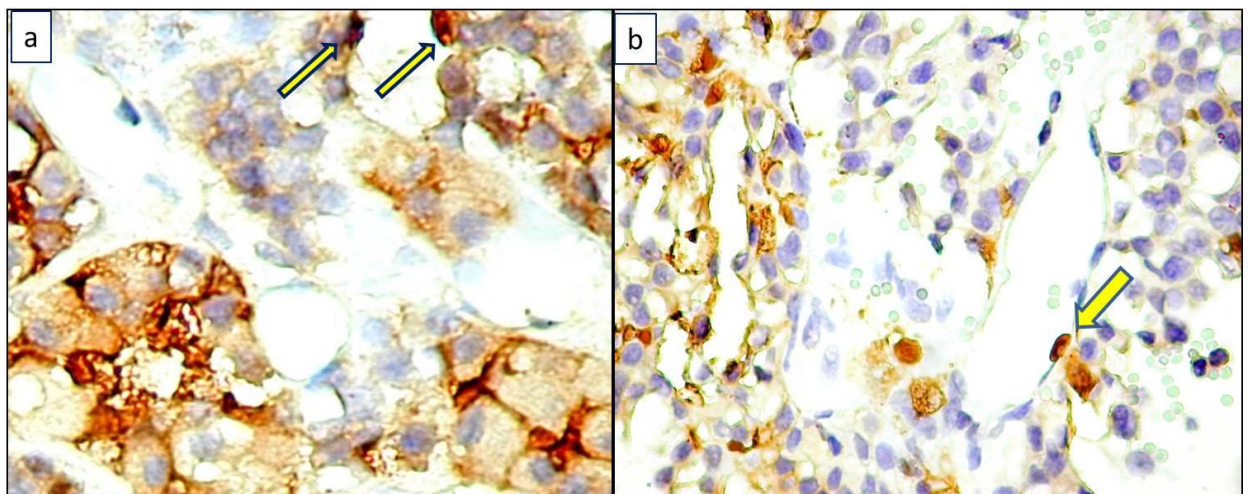


Fig.4.18. Reacție imunohistochimică pozitivă pentru proteina S100 cu expresie nucleară în celulele endoteliale care tapetează capilarele sanguine din hipofiza normală (a, săgeată) și vasele din adenoamele hipofizare (b, săgeată).

Procentul de cazuri pozitive pentru proteina S100 a fost de 66,12% din numărul total. Dintre acestea, 39,02% au prezentat un pattern de creștere compact, 39,04% au fost de tip papilar, 9,75% au avut un pattern de creștere trabecular, 4,87% fusiform și 7,31% au fost de tip alveolar. Adenoamele hipofizare de tip papilar au înregistrat cea mai mare intensitate de expresie

a proteinei S100 în celulele tumorale (Figura 4.19a). Cu excepția adenoamelor de tip papilar, în majoritatea cazurilor de adenom hipofizar intensitatea reacției a fost slabă și moderată, în comparație cu țesutul normal (Figura 4.19b).

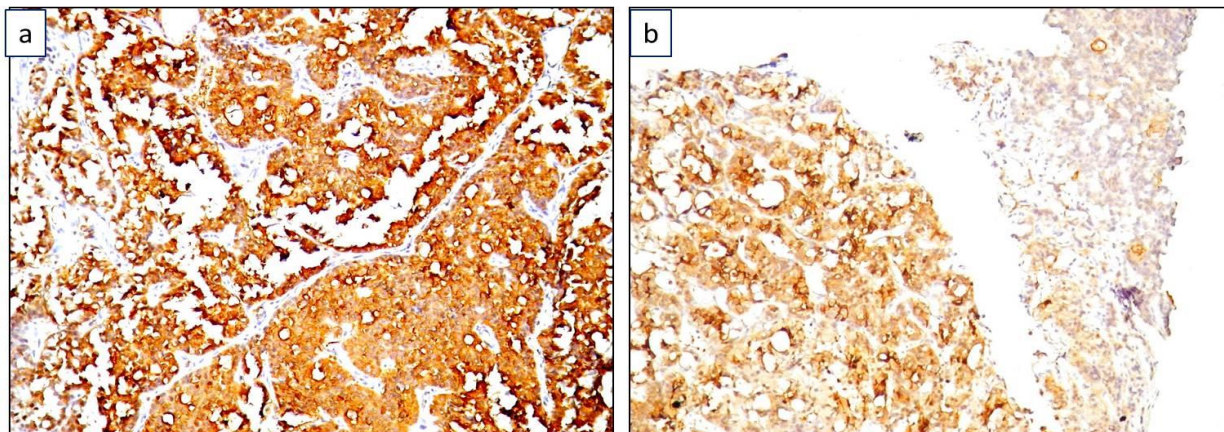


Fig. 4.19. Intensitatea crescută a proteinei S100 în adenoamele hipofizare de tip papilar (a) și expresie moderată în țesutul adenomatos (b, secțiunea dreaptă) comparativ cu hipofiza normală (b, secțiunea din stânga).

Celulele acidofile au fost prezente într-un procent de 34,2% din cazuri. Adenoamele hipofizare cu celule bazofile au reprezentat un procent de 26,8% din cazurile pozitive pentru proteina S100, iar, pentru 39% din cazuri componenta cromofobă a fost prezentă constituind adenoame hipofizare pur cromofobe sau mixte cromofob-acidofile/bazofile.

Ca particularități imunohistochimice ale expresiei proteinei S100, am observat variabilități în prezența, intensitatea și distribuția acestui marker în raport cu profilul hormonal. Adenoamele hipofizare GH secretante au fost extrem de heterogene în ceea ce privește expresia proteinei S100 în celulele tumorale. Cazurile au variat de la absența expresiei în celulele tumorale (celulele folicular stelate fiind pozitive, (Figura 4.20a) la expresie slabă, cu localizare strict citoplasmatică (Figura 4.20b) la expresie intensă, în toată aria tumorală, nuclear și citoplasmatic (c) sau doar citoplasmatic (d) [198].

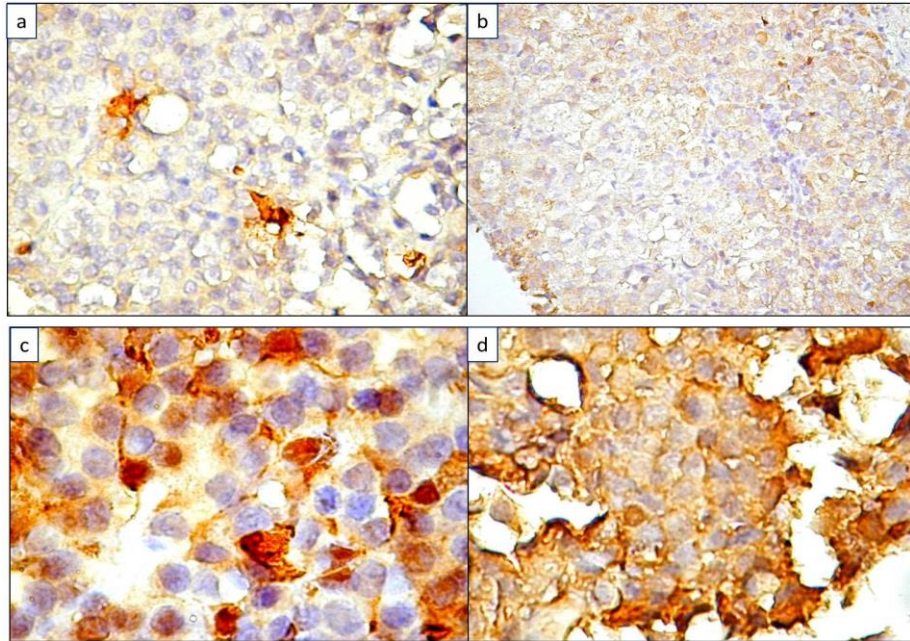


Fig. 4.20. Variabilitatea expresiei proteinei S100 în adenoamele hipofizare GH secretante: absentă (a), slabă(b), intensă, nuclear și citoplasmatic (c) și intensă, citoplasmatic (d).

Pentru adenoamele cu celule cromofobe, expresia proteinei S100 a fost slabă în citoplasma celulelor cromofobe, fiind în cele mai multe cazuri restricționată nuclear (Figura 4.21).

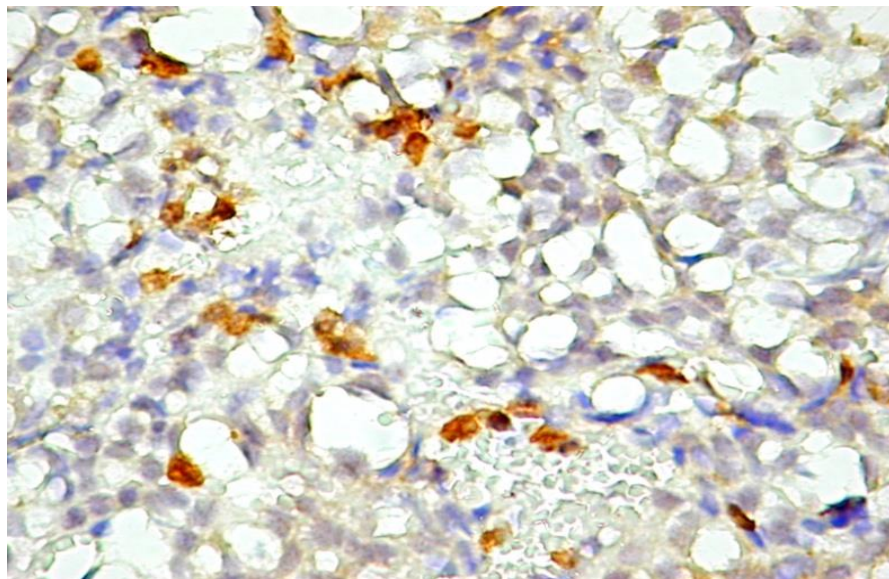


Fig. 4.21. Adenom hipofizar de tip cromofob cu celule cromofobe negative pentru proteina S100 în citoplasmă, cu expresie heterogenă și focală în nucleii celulelor cromofobe și citoplasma și nucleul celulelor foliculare stelate inserate printre celulele cromofobe. Și în acest caz se remarcă celule endoteliale S100 pozitive nuclear.

Aspectul particular pe care l-am remarcat la expresia GFAP în adenoamele ACTH secretante, s-a repetat și în cazul expresiei proteinei S100. Celulele tumorale au fost negative pentru proteina S100. În schimb, în jurul spațiilor vasculare, au fost distribuite celule S100 pozitive cu expresie nucleară și citoplasmatică, și cu o morfologie de celule folicular stelate. Prelungirile celulelor folicular stelate au fost strâns apozitionate de peretele vasului sanguin, fiind de asemenea interconectate unele cu altele (Figura 4.22a). Aceste interconexiuni au creat o rețea de prelungiri S100 pozitive printre care erau distribuite celulele tumorale [198]. Focal, în imediata vecinătate a celulelor S100 pozitive, celulele tumorale au prezentat o reacție slabă și inconstantă cu distribuție strict citoplasmatică (Figura 4.22b).

Ca și în cazul adenoamelor hipofizare GH secretante, celulele endoteliale ale vaselor din vecinătatea celulelor S100 pozitive au avut reacție pozitivă la proteina S100 cu distribuție nucleară (Figura 4.22c). În restul masei tumorale celulele S100 pozitive cu morfologie folicular stelată au fost rar întâlnite în adenoamele hipofizare ACTH secretante.

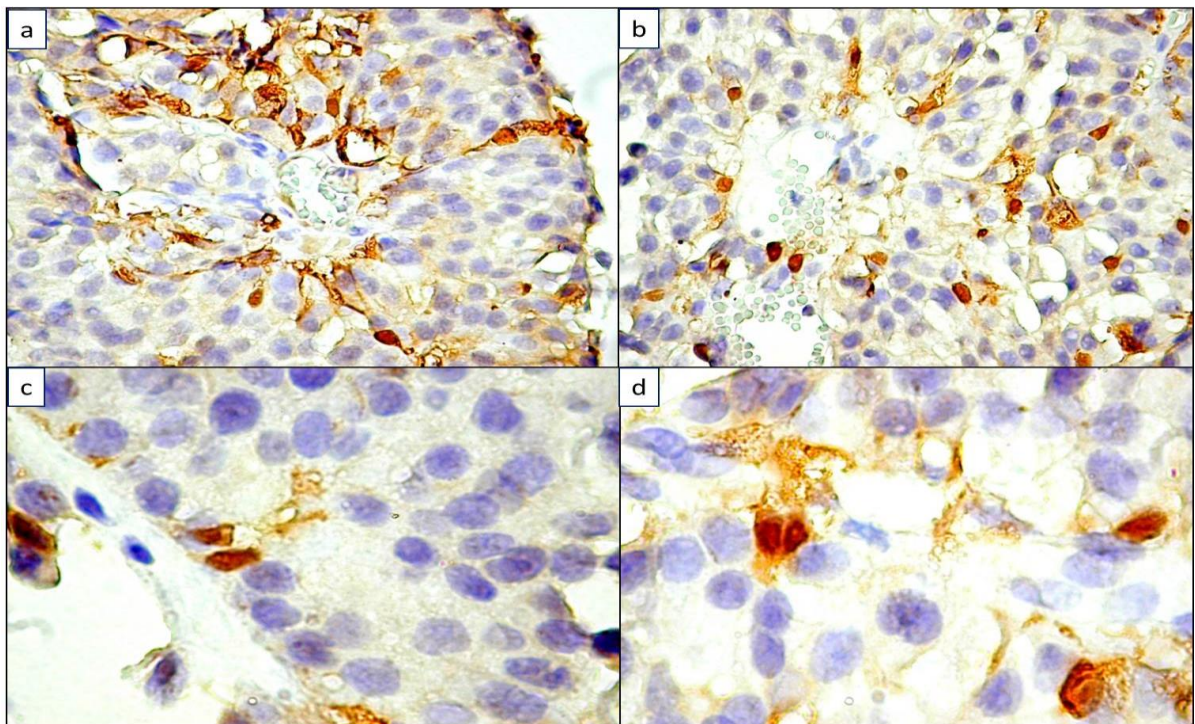


Fig. 4.22. Proteina S100 exprimată în adenoamele hipofizare ACTH secretante. Celule S100 pozitive la nivel nuclear și citoplasmatic, distribuite în palisadă în jurul vaselor sanguine (a). Celulele prezintă numeroase prelungiri ramificate, inserate printre celulele tumorale, pe de o parte și interconectate între ele formând rețele (b, c). Ocazional, celulele S100 pozitive au fost observate în grupuri printre celulele tumorale care au prezentat focal reacție slabă la proteina S100 (b,d).

Raportat la profilul hormonal, nici unul dintre cei șase hormoni utilizați în realizarea profilului imunohistochimic nu s-a corelat semnificativ statistic cu expresia proteinei S 100.

În schimb, dintre factorii de creștere și receptorii corespondenți, proteina S100 s-a corelat semnificativ statistic cu expresia EGFR în cazurile pentru care proteina S100 a avut o expresie moderată sau intensă. Analiza statistică a acestei corelații este redată în Figura 4. 23.

EGFR	Pearson Correlation	EGFR	S100	Kendall's tau_b	EGFR	Correlation Coefficient	EGFR	S100	
		1.000	.245					1.000	.230
	Sig. (1-tailed)		.029					Sig. (1-tailed)	
	N	61	61			N	61	61	
S100	Pearson Correlation	.245	1.000	Spearman's rho	EGFR	Correlation Coefficient	EGFR	S100	
		.245	1.000					1.000	.269
	Sig. (1-tailed)	.029						Sig. (1-tailed)	
	N	61	61			N	61	61	
				S100	Correlation Coefficient		.269	1.000	
							Sig. (1-tailed)		.018
							N	61	61

Fig. 4.23. Analiza statistică a corelației S100 și EGFR în adenoamele hipofizare

Discuții. Expresia GFAP și a proteinei S100 a fost studiată în adenoamele hipofizare, fiind frecvent asociată cu celulele foliculostelate [72, 137]. Expresia lor în celulele tumorale, cuantificată separat în variatele tipuri de adenoame hipofizare reprezintă un subiect sporadic în literatură și, din acest motiv, corelațiile cu prognosticul, supraviețuirea pe termen lung, recidivele și implicațiile terapeutice sunt extrem de neconvingătoare în prezent. Date din ce în ce mai numeroase sugerează capacitatea celulelor endocrine tumorale și non tumorale de a se transdiferenția în celule foliculostelate în care cei doi markeri se suprapun din punct de vedere al expresiei imunohistochimice, aceste celule FS fiind de fapt considerate ca celule stem pluripotente [129, 209]. Fenomenul de „retrodiferențiere” a fost observat și descris în special în cazul adenoamelor hipofizare ACTH secretante [209]. În studiul nostru am observat de asemenea un aspect particular de distribuție, localizare și expresie a GFAP și S100 pentru adenoamele hipofizare ACTH secretante. Celulele FS, GFAP+/S100+ au fost distribuite în jurul vaselor

sanguine sau au delimitat spații pseudovasculare. Am remarcat o densitate ușor crescută a acestora prin imunocolorarea cu GFAP comparativ cu proteina S100. Această discrepanță a fost susținută de datele statistice care au arătat că doar GFAP s-a corelat semnificativ statistic cu expresia ACTH în timp ce proteina S100 nu a prezentat corelație semnificativ statistică, în ciuda concordanței de distribuție și morfologie. Această discrepanță de expresie sugerează două ipoteze: (I) existența a două subpopulații de celule FS, una imatură care exprimă doar proteina S100 cu o mare capacitate de diferențiere și o populație de celule FS mature GFAP+/S100+ cu un rol bine stabilit, acela de interconexiune între celulele endocrine și vasele capilare fenestrate, dat fiind distribuția și localizarea acestora descrise anterior corelat cu expresia tardivă a GFAP comparativ cu proteina S100; (II) existența aceleiași populații celulare dar care poate prezenta mai multe faze evolutive. Aceste ipoteze urmează să fie demonstrate sau infirmate prin cunatificarea markerilor pentru celulele stem pluripotente. Oricum, nici una din cele două ipoteze nu explică reacția negativă pentru GFAP și S100 în celulele tumorale ale adenoamelor hipofizare ACTH secretante, comparativ cu alte tipuri de adenoame hipofizare. Ca un paradox, descrierea expresiei proteinei S100 și a GFAP în hipofiza normală este restricționată doar la evaluarea celulelor FS. Nu am găsit în literatură date referitoare la expresia GFAP și a proteinei S100, diferit față de celulele endocrine ale glandei hipofize umane normale. Am remarcat prezența GFAP în celulele acidofile, secretante de GH în timp ce proteina S100 a manifestat o expresie imunohistochimică moderată în celulele acidofile și slabă în celulele cromofobe. Pattern-ul de expresie s-a păstrat și în cazul adenoamelor hipofizare GH secretante în care am remarcat o variabilitate de expresie a GFAP și proteinei S100. Acest aspect a fost în special evident în cazul adenoamelor hipofizare mixte în care componenta GH secretantă era intens pozitivă pentru GFAP sau proteina S100 în timp ce componenta bazofilă era negativă și cea cromofobă slab pozitivă sau negativă la proteina S100. Există în prezent un singur model experimental care susține datele pe care le-am găsit noi, referitoare la corelația dintre GFAP, ACTH și LH. Acest model a demonstrat că, inducția supraexpresiei Bmi1 de către GFAP determină în model experimental murin, dezvoltarea de adenoame hipofizare în porțiunea anterioară și intermediară a adenohipofizei [329]. Peste 50% din adenoamele hipofizare supraexprimă Bmi1 [329] procent care se suprapune cu procentul de adenoame hipofizare GFAP+ pe care l-a găsit în studiul nostru. Totodată, s-a demonstrat că astfel de adenoame hipofizare cresc secreția de ACTH, aspect care, de asemenea este în concordanță cu datele observate și cuantificate în prezentul studiu. Asocierea semnificativ statistică a GFAP cu VEGF nu a fost surprinzătoare, dat fiind faptul că VEGF a fost izolat inițial din celulele FS ale

adenohipofizei bovine [112, 230] și, mai mult decât atât adenoamele hipofizare au exprimat VEGF și în celulele tumorale. În schimb, lipsa asocierii VEGF cu proteina S100 contrabalansată de asocierea S100-EGFR susține prezența a două populații distincte de celule foliculostelate și celule adenoamtoase cu funcții diferite și mai mult cu rol prognostic și terapeutic bine definit. Mai mult, asocierea S100-EGFR reprezintă un factor de prognostic nefavorabil, care stimulează proliferarea, invazia și metastazarea celulelor tumorale în carcinoamele hepatocelulare, [186] glioblastoame [145] sau melanoame [328]. Până în prezent adenoamele hipofizare nu au fost caracterizate din acest punct de vedere. Datele noastre sugerează implicarea acestui mecanism în adenoamele hipofizare GH secretante și, cel mai probabil și PRL secretante dar aceste date necesită să fie validate prin studii ulterioare.

4.3. Concluzii la capitolul 4

1. Expresia GFAP și proteinei S100 în celulele tumorale este implicată 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.
2. Rezultatele noastre susțin prezența a două subtipuri moleculare de celule foliculostelate respectiv GFAP+/VEGF+/S100- și o alta GFAP-/S100+/EGFR+ concomitent cu varianta clasică GFAP+/S100+.
3. Prin analogie cu observațiile obținute în alte tipuri tumorale, este posibil ca adenoamele hipofizare S100+/EGFR+ să reprezinte un grup de adenoame hipofizare cu un comportament agresiv și o capacitate de invazie și recurență crescute, aspecte ce reprezintă un factor de prognostic nefavorabil.
4. Axul GFAP-ACTH-LH este studiat momentan doar în model experimental dar pare să favorizeze dezvoltarea adenoamelor hipofizare în regiunile anterioară și intermediară a adenohipofizei, adenoame caracterizate de un prognostic nefavorabil.

5. IMPLICAREA FACTORILOR DE CREȘTERE ȘI A RECEPTORILOR CORESPONDENȚI ÎN PATOLOGIA ADENOAMELOR HIPOFIZARE

5.1. Rolul factorilor de creștere VEGF, VEGF165b, PDGF și a receptorilor corespondenți în adenoamele hipofizare

5.1.1. VEGF-factorul de creștere al endoteliului vascular în patogeneza, evoluția și terapia adenoamelor hipofizare

VEGF descris ca factor de permeabilitate vasculară, izolat din hipofiza bovină, VEGF a fost intens studiat în adenoamele hipofizare, la fel ca și în alte tipuri de tumori prin prisma rolului său de activator al angiogenezei tumorale cu rol în proliferarea, migrarea și organizarea vaselor de neoformație.

VEGF reprezintă o țintă terapeutică pentru care există deja dezvoltată o terapie cu anticorpi monoclonali umanizați de tip bevacizumab în cancerul de colon cu metastaze [156]. Încercări de a utiliza VEGF ca factor de prognostic și țintă terapeutică au fost făcute și în cancerul mamar cu metastaze dar rezultatele trialurilor clinice sunt controversate [67, 167].

În adenoamele hipofizare, VEGF a fost intens studiat privind implicarea sa în procesul angiogenic și, mai puțin ca țintă terapeutică fiind asociat cu fenotipul agresiv și invaziv al adenoamelor hipofizare. Există foarte puține studii privind corelațiile dintre tipul histopatologic și profilul hormonal al adenoamelor hipofizare și supraexpresia VEGF în aceste tipuri de tumori, majoritatea fiind realizate pe baza rezultatelor imunohistochimice. Nu există încă, până în prezent un rol prognostic și terapeutic al expresiei VEGF în adenoamele hipofizare. Din acest motiv, studiul de față și-a propus reevaluarea expresiei și distribuției VEGF în adenoamele hipofizare precum și validarea sau invalidarea sa ca factor predictiv pentru prognosticul și terapia adenoamelor hipofizare, în special pentru cele invazive sau cu un fenotip agresiv.

Studiul VEGF în adenoamele hipofizare a inclus două metode de detecție. Inițial, VEGF a fost testat prin imunohistochimie, fiind studiată expresia proteică a acestuia. Imunohistochimia a fost completată și validată respectiv prin metoda de hibridizare in situ de detecție a VEGF mRNA pe țesuturile la parafină.

Imunohistochimic, VEGF a fost pozitiv în 45% din cazurile incluse în studiu. Au fost observate două pattern-uri de expresie a VEGF: un pattern membranar (Figura 5.1a), cu intensitate ridicată și omogenă, pe toată circumferința celulelor tumorale pozitive și un pattern

citoplasmatic, granular (Figura 5.1, b).În unele cazuri, cele două pattern-uri au fost observate concomitent în celulele tumorale, fie combinate pentru aceeași celulă (Figura 5.1c), fie, în cazul adenoamelor hipofizare mixte, separate în diferitele celule tumorale care au intrat în componența acestora.

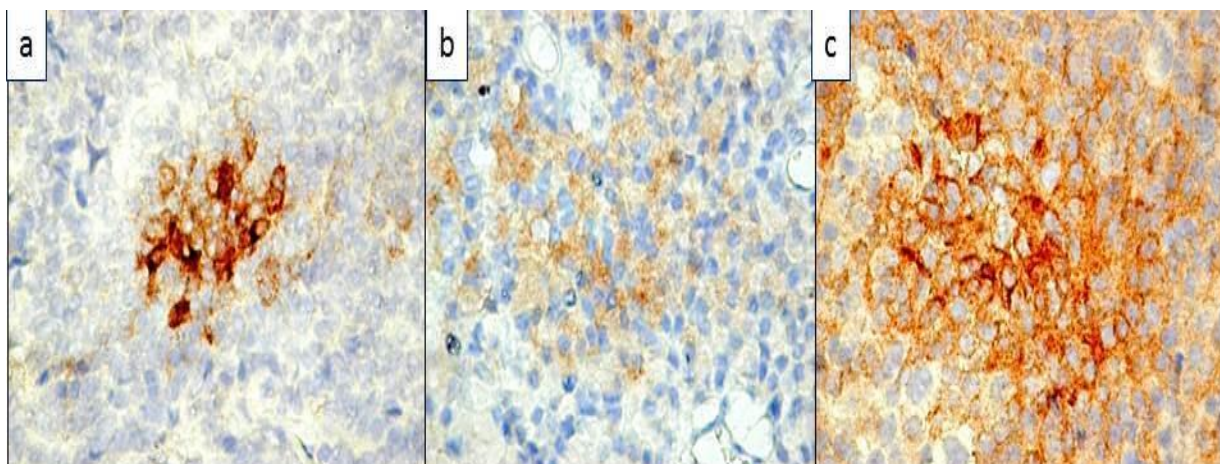


Fig. 5.1. Pattern-ul de expresie al VEGF în adenoamele hipofizare: membranar (a), citoplasmatic difuz (b), membranar și citoplasmatic (c).

Totodată, raportat la aria de distribuție a reacției imunohistochemice, VEGF a avut o expresie difuză, fiind pozitiv în toată aria tumorală (Figura 5.2a) sau o expresie focală, insulară, arii intens pozitive la VEGF fiind înconjurate de arii de celule tumorale negative la VEGF (Figura 5.2b, 2c).

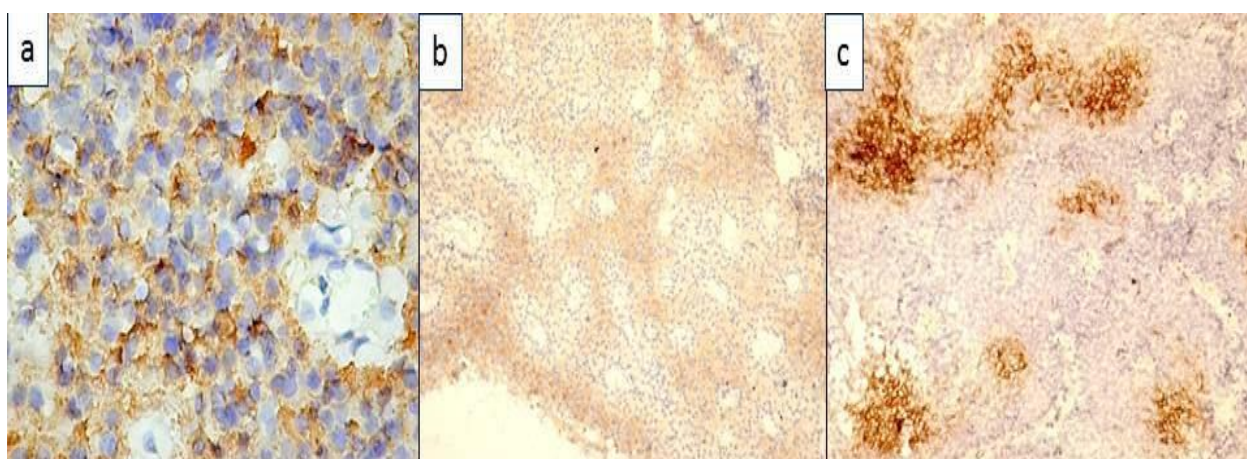


Fig.5.2. Distribuția difuză a expresiei imunohistochemice a VEGF (a), focală, cu pattern citoplasmatic (b) și insulară, cu pattern membranar(c).

Expresia difuză a fost caracteristică adenoamelor hipofizare secretante de GH și PRL în timp ce aspectele focale și insulare au predominat în adenoamele secretante de TSH, ACTH și LH. Pentru adenoamele nonsecretante cu profil hormonal negativ pentru toate tipurile de hormoni, reacția imunohistochimică la VEGF a fost slabă sau absentă în majoritatea cazurilor; în componenta fusiformă, în celelalte tipuri celulare expresia VEGF fiind absentă. Dintre acestea, 51,85% din cazuri au fost adenoame hipofizare de tip acidofil pur sau mixte cu o componentă de tip acidofil. Pattern-ul cromofob a fost prezent în 25% din cazurile pozitive la VEGF, iar cel bazofil în 23,15% din numărul total de cazuri.

Raportat la profilul hormonal, expresia imunohistochimică a VEGF a fost asociată cu expresia fiecărui hormon în parte. Dintre hormonii incluși în profilul imunohistochimic, GH a prezentat o corelație semnificativ statistică cu expresia VEGF, pentru aceasta fiind obținut un $p=0,024$ (Figura 5.3). Totodată, prolactina a prezentat o suprapunere parțială a expresiei sale cu cea a VEGF (p Kendall=0.020, p Spearman=0.043, Figura 5.4). Rezultatele statistice obținute susțin procentul de peste 50% al adenoamelor hipofizare cu caracter acidofil, fiind bine cunoscut faptul că celulele de tip acidofil sunt secretante de GH și PRL [14].

GH	Pearson Correlation	GH	VEGF	Kendall's tau_b	GH	Correlation Coefficient	GH	VEGF
	Sig. (2-tailed)	1.000	.470			1.000	.449	
	N	23	23			23	23	
VEGF	Pearson Correlation	.470	1.000	Spearman's rho	GH	Correlation Coefficient	1.000	.506
	Sig. (2-tailed)	.024	.			Sig. (2-tailed)	.	.014
	N	23	23			N	23	23
					VEGF	Correlation Coefficient	.449	1.000
						Sig. (2-tailed)	.020	.
						N	23	23
						Correlation Coefficient	.506	1.000
						Sig. (2-tailed)	.014	.
						N	23	23

Fig.5.3. Evaluarea statistică a corelației Pearson (a), Kendall și Spearman (b) dintre expresia imunohistochimică a GH și cea a VEGF

Kendall's tau_b	GH	Correlation	1.000	.372
		Coefficient		
		Sig. (2-tailed)	.	.049
		N	23	23
Spearman's rho	PRL	Correlation	.372	1.000
		Coefficient		
		Sig. (2-tailed)	.049	.
		N	23	23
Kendall's tau_b	GH	Correlation	1.000	.425
		Coefficient		
		Sig. (2-tailed)	.	.043
		N	23	23
Spearman's rho	PRL	Correlation	.425	1.000
		Coefficient		
		Sig. (2-tailed)	.043	.
		N	23	23

Fig. 5.4. Evaluarea statistică a Kendall și Spearman dintre expresia imunohistochimică a GH și PRL pentru cazurile pozitive la VEGF

Referitor la intensitatea expresiei imunohistochimice a VEGF, în adenoamele hipofizare GH pozitive, VEGF a avut o expresie mixtă citoplasmatică notată cu + 3, cu un pattern granular combinat cu o intensificare membranară. Adenoamele hipofizare cu profil hormonal mixt de tip GH-PRL s-au caracterizat printr-o expresie moderată notată cu +2 dar cu o densitate crescută a celulelor pozitive. Pentru profilul hormonal GH-TSH intensitatea expresiei VEGF a fost mare, notată cu +3 [14].

Un aspect particular, extrem de interesant, a fost observat în adenoamele hipofizare ACTH pozitive și TSH pozitive. Arii de celule VEGF pozitive, cu intensificare membranară și cu aspect insular, înconjurate de celule negative la VEGF au fost observate pe toată suprafața de secțiune a specimenelor analizate (Figura 5.5).

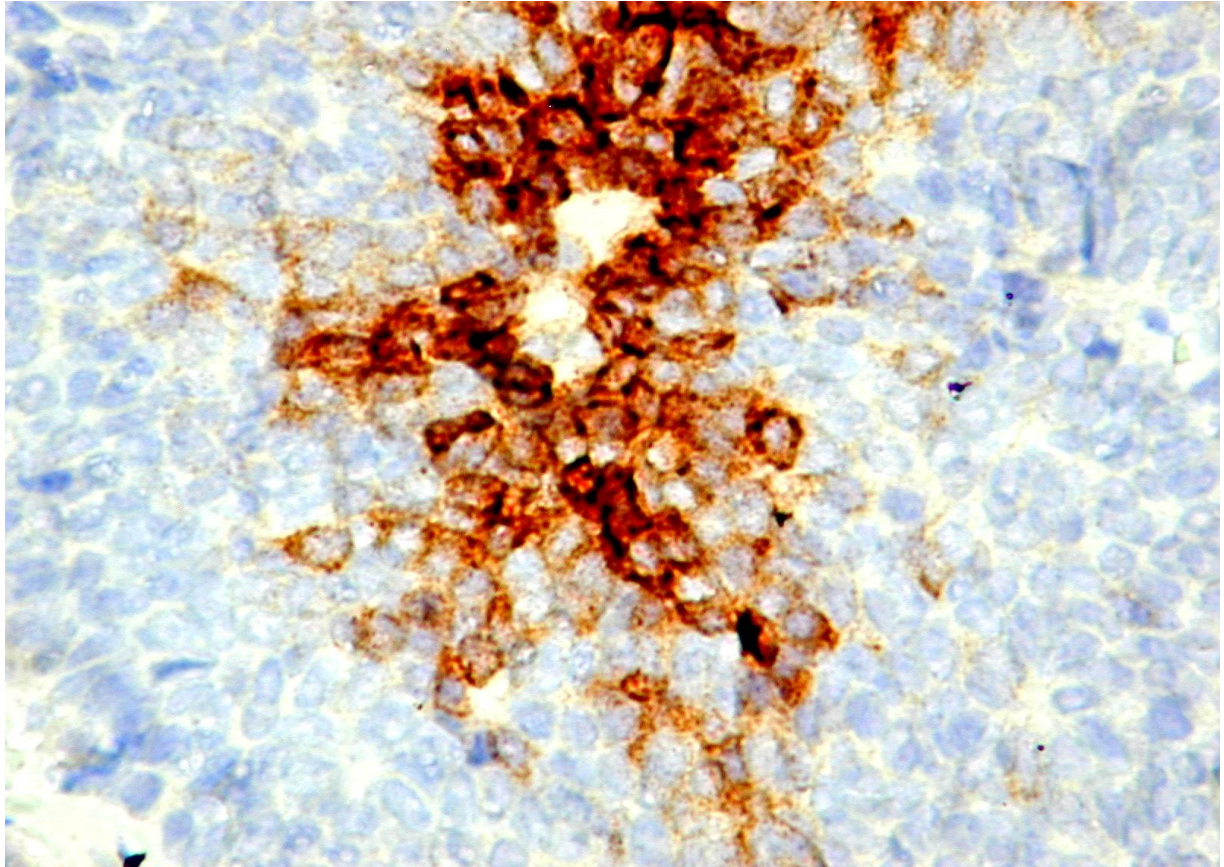


Fig. 5.5. Insulă de celule VEGF pozitive, în cadrul unui adenom hipofizar ACTH secretant.

De cele mai multe ori, aceste arii VEGF pozitive au fost centrate de vase sangvine ori s-au grupat în jurul ariilor hemoragice. Alteori, celulele VEGF pozitive par să fie structuri ce delimitează spații pseudovasculare, cu conținut bogat sanguinolent, dând aspectul de mimetism vasculogenic întâlnit și în alte tipuri de tumori ca melanomul malign sau glioblastomul multiform.

Din totalul adenoamelor hipofizare VEGF pozitive, 77,4% au prezentat o intensitate moderată și mare, fiind notate cu +2 și +3. Pentru confirmarea imunohistochimiei, aceste cazuri au fost selectate pentru metoda de detecție a RNA bazată pe *hibridizarea in situ* aplicată pe secțiunile de parafină. Un procent de 88,24% dintre cazurile evaluate prin hibridizare *in situ* au fost pozitive la VEGF. Intensitatea semnalului de amplificare a fost evaluat în funcție de numărul semnalelor pozitive cu distribuție nucleară. Astfel, am observat o eterogenitate a amplificării genice a VEGF în adenoamele hipofizare, variind de la +1 la +4 (Figura 5.6a-d), 53,33% fiind evaluate cu un scor de 3 și 4.

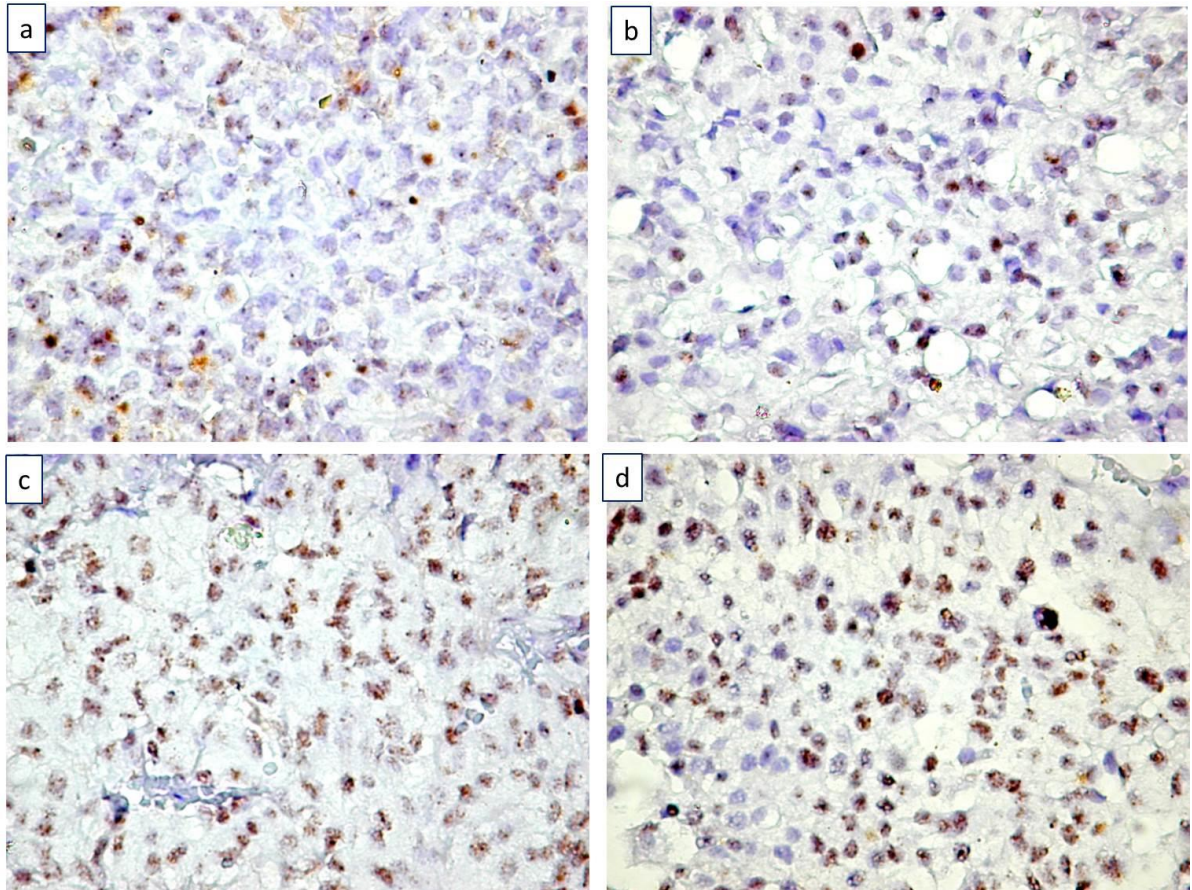


Fig. 5.6. Scorul de interpretare al VEGF mRNA în adenoamele hipofizare. Amplificare genică notată cu +1 (a), +2 (b), +3 (c) și +4 (d). De remarcat pattern-ul de amplificare de la amplificare punctiformă cu semnale distincte (a) la clusteres și grupuri de semnale intens pozitive pentru proba VEGF mRNA(d).

Amplificarea genică pentru VEGF mRNA a prezentat o expresie heterogenă dependentă de pattern-ul de creștere al adenoamelor hipofizare. Pattern-ul papilar a fost caracterizat în toate cazurile printr-o amplificare genică notată cu +4, în care s-au descris clusteres nucleare cu intensitate și densitate crescută. Practic, toate celulele epiteliale tumorale au prezentat amplificare genică, în pattern-ul papilar cu celule acidofile (Figura 5.7a). Pentru pattern-ul solid, s-a demonstrat de asemenea o amplificare genică înaltă (Figura 5.7b) dar, spre deosebire de pattern-ul papilar, s-a înregistrat predominanța semnalelor nucleare punctiforme distincte (Figura 5.7c) și, într-o mică măsură a clusterelor de amplificare așa cum a fost identificat pentru pattern-ul papilar acidofil (Figura 5.7d).

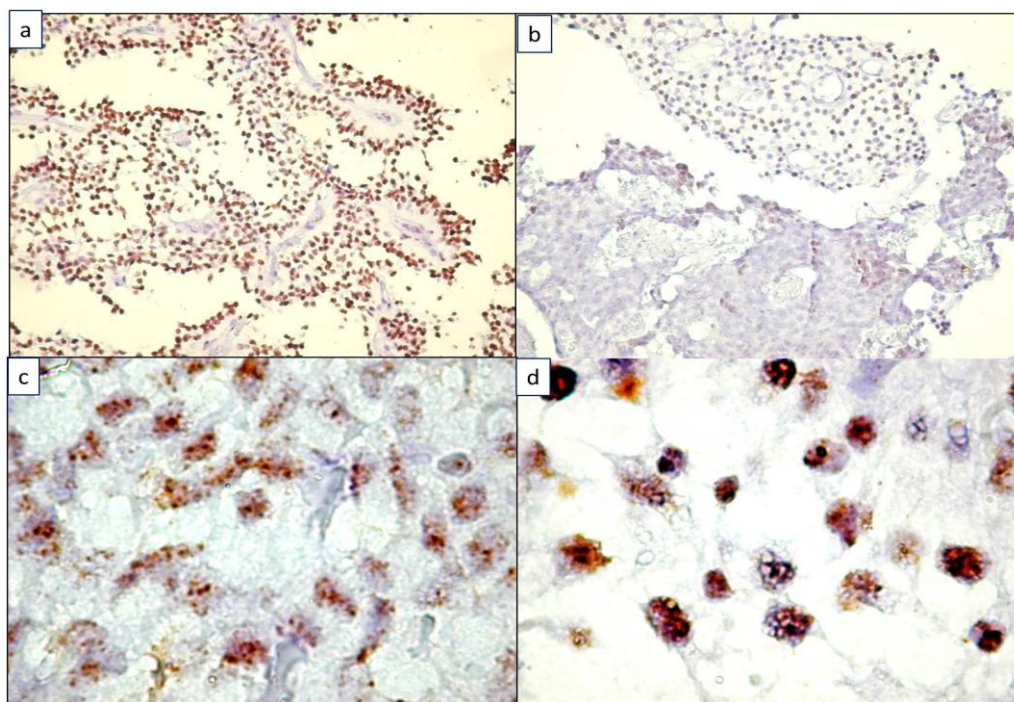


Fig. 5.7. Amplificare genică crescută în pattern-ul papilar notată cu +4 (a) și amplificare heterogenă într-un adenom hipofizar cu componentă solidă și papilară(b). Semnale nucleare distincte pentru celulele acidofile ale adenoamelor hipofizare de tip solid (c), comparativ cu prezența clusterelor pentru celulele , de asemenea acidofile din adenoamele papilare (d).

În unele zone, celulele tumorale ce au prezentat amplificare genică pentru VEGF mRNA au avut tendința de a se distribui în vecinătatea vaselor sanguine (Figura 5.8).

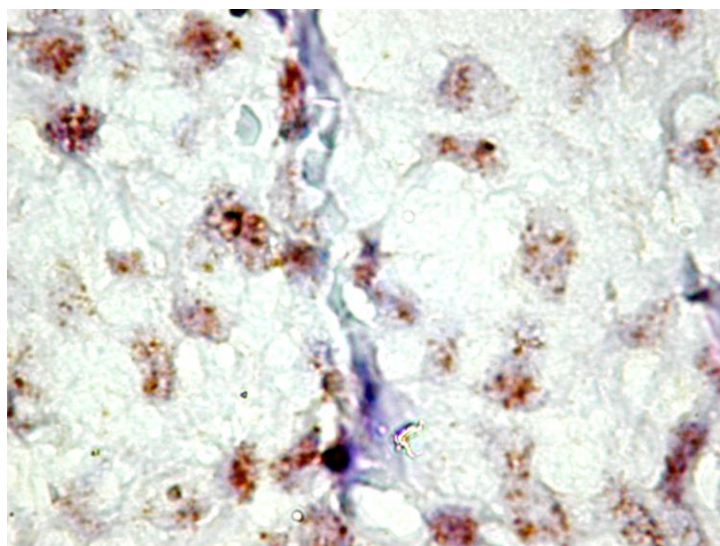


Fig. 5.8. Celule tumorale cu amplificare pentru VEGF mRNA distribuite de-a lungul unui vas sanguin

Spre deosebire de expresia imunohistochimică a VEGF ce a fost restricționată la nivelul celulelor tumorale, VEGF mRNA a fost detectat și în alte tipuri de celule incluse în ariile tumorale. Astfel, numeroase vase de tip capilar au fost delimitate de celule endoteliale cu amplificare pentru VEGF mRNA (Figura 5.9a). Un aspect particular a fost observat în cazul vaselor de tip capilar care prezentau fenomenul de intususceptie, respectiv pilieri intravasculari unde am decelat celule endoteliale ce au prezentat semnal pozitiv pentru VEGF mRNA incluse în structura pilierilor intravasculari (Figura 5.9b, c).

Celulele folicular stelate au avut o supraexpresie a VEGF mRNA particulară, comparativ cu celelalte tipuri celulare. Astfel, supraexpresia VEGF mRNA a avut un pattern citoplasmatic și un pattern nuclear foarte intens (Figura 5.9d).

Cazurile cu amplificare genică au fost reevaluate, privind corelațiile cu tipul hormonal precum și cu ceilalți factori de creștere sau receptori tirozin kinazici incluși în studiu. Tabloul corelațiilor dintre VEGF mRNA, profilul hormonal, al factorilor de creștere și indicelui de proliferare, a fost comparat cu cel obținut la corelarea expresiei imunohistochimice a VEGF cu același spectru de parametri.

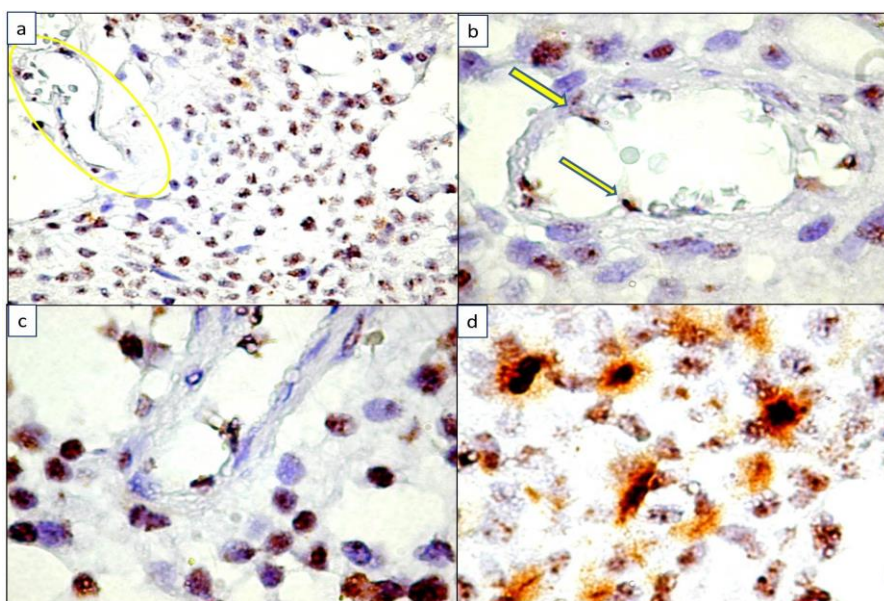


Fig. 5.9. Alte tipuri celulare ce au prezentat amplificare genică pentru VEGF mRNA. Celulele endoteliale din vasele peritumorale (a) au prezentat un semnal intens pentru VEGF mRNA, iar în vasele care au fost splitate de pilieri intravasculari am observat celule endoteliale cu amplificare VEGF mRNA la baza acestora (b, săgeată) sau în structura pilierului(c). Celule folicular stelate inserate printre celulele tumorale, cu o expresie crescută a VEGF mRNA (d).

Concordanță dintre expresia imunohistochimică a VEGF și amplificarea genică a VEGF mRNA obținută pe secțiuni la parafină a fost semnificativ statistică, aspect extrem de important, cu rol confirmativ pentru evaluarea expresiei VEGF în adenoamele hipofizare (Figura 5.10).

S-a păstrat corelația semnificativ statistică între expresia GH și amplificarea genică a VEGF mRNA.

		IHC	RNA		
IHC	Kendall's tau_b	Correlation Coefficient	1.000	.418	
		Sig. (2-tailed)	.	.035	
	N	23	23		
	RNA	Correlation Coefficient	.418	1.000	
		Sig. (2-tailed)	.035	.	
		N	23	23	
RNA	Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	.462	
		Sig. (2-tailed)	.	.026	
	N	23	23		
	IHC	Correlation Coefficient	.462	1.000	
		Sig. (2-tailed)	.026	.	
		N	23	23	

Fig.5.10. Evaluarea statistică dintre expresia imunohistochimică a VEGF și amplificarea genică a VEGF mRNA

5.1.2. VEGF165b în patogeneza adenoamelor hipofizare.

Expresia crescută a VEGF în majoritatea adenoamelor hipofizare corelată cu densitatea vasculară scăzută, cuantificată în studiile anterioare pe hipofiză, ne-a obligat să identificăm dacă, varianta inhibitorie a VEGF, respectiv VEGF165b este de asemenea supraexprimată în adenoamele hipofizare, ca o posibilă explicație a MVD scăzute. Din acest motiv, s-a realizat, prin metoda imunohistochimică, cuantificarea VEGF165b. Interpretarea reacției imunohistochimice s-a realizat similar cu cea a VEGF.

Un procent de 16,66% din cazurile studiate au avut reacție pozitivă la VEGF165b. În majoritatea cazurilor, reacția a fost de intensitate slabă, notată cu +1 și, în 7 cazuri am înregistrat reactive moderată cu intensitate +2. Pattern-ul de expresie a fost citoplasmatic, granular (predominant) și în rare cazuri membranar, combinat cu cel citoplasmatic. Raportat la tipul histopatologic, toate cazurile VEGF165b pozitive au fost de tip acidofil sau au inclus arii de celulele acidofile, în cazul adenoamelor hipofizare mixte.

Reacția imunohistochimică nu a fost restricționată la celulele tumorale. În cazurile în care celulele tumorale au fost negative la VEGF165b, am observat celule izolate pozitive, cu citoplasma granulară, cel mai probabil macrofage (Figura 11a) sau mastocite (Figura 11b) incluse în ariile tumorale. Rare celule cu o morfologie similară celulelor foliculare stelate au fost de asemenea remarcate ca fiind pozitive la VEGF165b (Figura 5.11c).

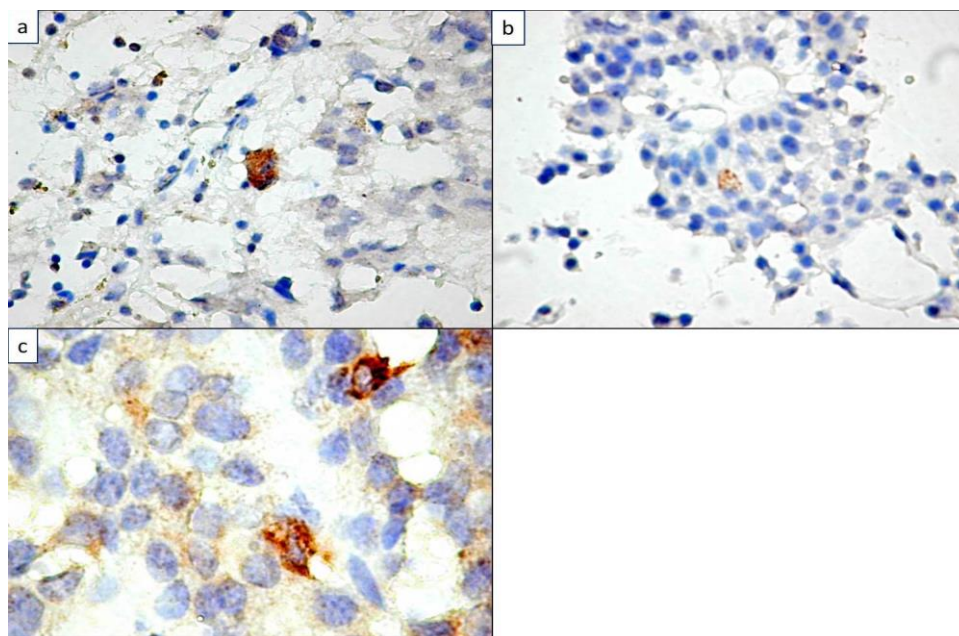


Fig. 5.11. Tipuri celulare pozitive la pentru VEGF165b cu morfologie de macrofag (a), mastocite (b) sau celule foliculare stelate (c).

Celulele tumorale au prezentat o reacție heterogenă, granular citoplasmatică, notată, în raport de numărul celulelor tumorale și intensitatea reacției cu +1, +2 și +3 (Figura 5.12a, b, respectiv c).

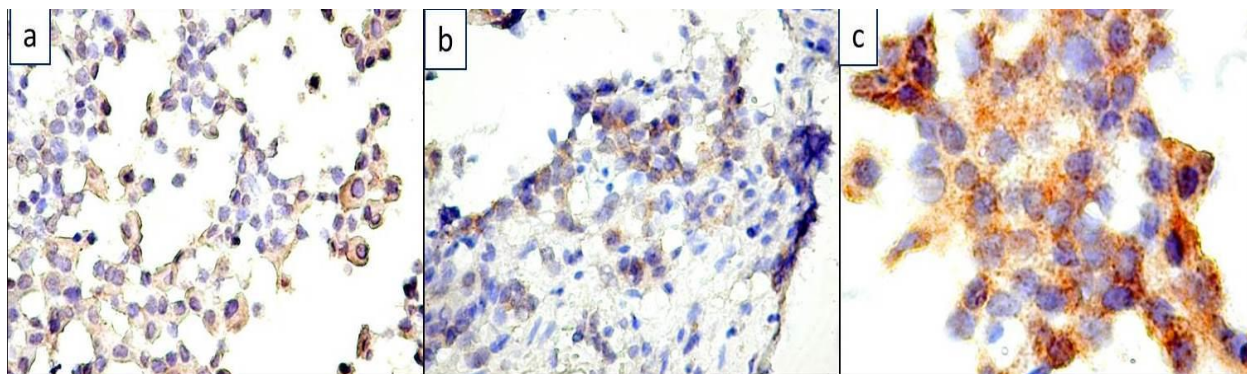


Fig. 5.12. Reacție pozitivă în celulele tumorale notată cu +1 (a), +2 (b) și +3 (c). Expresia a fost citoplasmatică și a avut un pattern granular.

Nu s-au observat vase sanguine în ariile tumorale pozitive la VEGF165b (Figura 5.13a). În schimb, celulele intens pozitive pentru fracțiunea inhibitorie a VEGF au avut tendința de a se dispune în jurul vaselor mature cu lumen patent (Figura 5.13b).

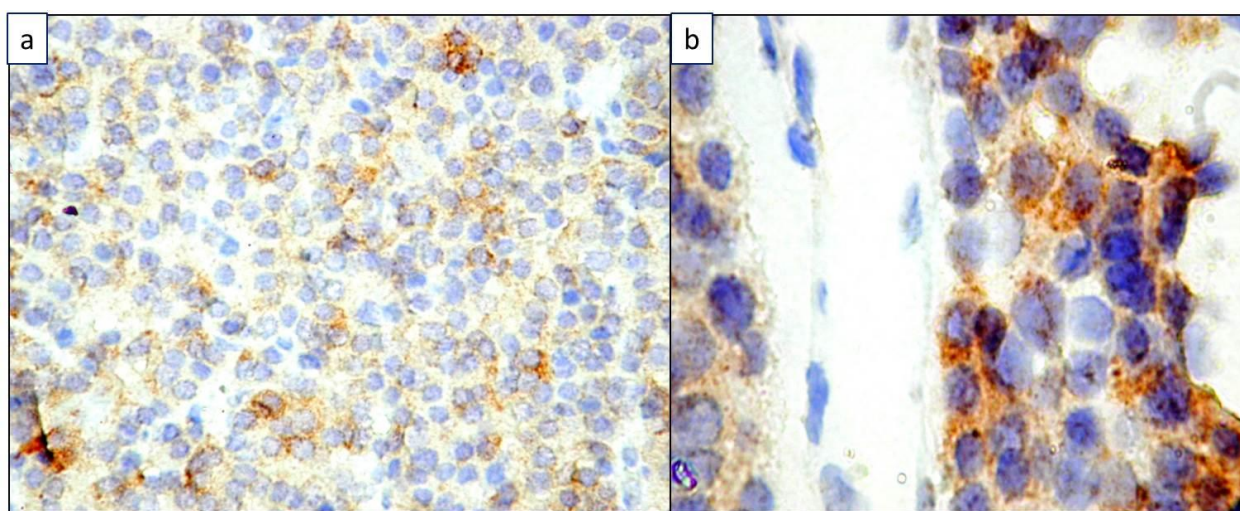


Fig. 5. 13. Arie tumorală pozitivă pentru VEGF165b, în care nu se observă vase sanguine cu lumen vizibil (a). Celule tumorale VEGF165b intens pozitive, grupate în jurul vaselor sanguine mature, cu lumen patent.

5.1.3. PDGF A și axul PDGF B/PDGFRβ în adenoamele hipofizare

Fiind bine cunoscuți ca factori mitogeni pentru celulele normale în dezvoltarea sistemului nervos cât și în cadrul proceselor tumorale maligne, PDGF A și B împreună cu receptorii corespondenți nu au încă un impact foarte bine descris în patogeneza adenoamelor hipofizare. Date disparate din literatură, grupate în mai puțin de 10 articole de cercetare referitoare la această temă, sugerează implicarea PDGFs și PDGFRbeta în modificările secreției hormonilor hipofizari, dar o corelație între profilul hormonal și expresia acestora nu este încă bine definită.

Expresia PDGF A a fost observată în 66,66% din cazurile de adenoame hipofizare incluse în studiu. Expresia imunohistochimică a fost citoplasmatică și membranară și, doar în cazuri izolate s-a remarcat prezența reacției pozitive cu localizare nucleară, scorul de interpretare fiind predominant de +2 și +3 (Figura 5.14 a, b, c, d). Adenoamele hipofizare papilare au constituit 34,14% din cazurile pozitive la PDGF A, fiind urmate de cele de tip compact (19,5%), mixte (17%), de tip fusiform (21,95%) și alveolar (7,4%).

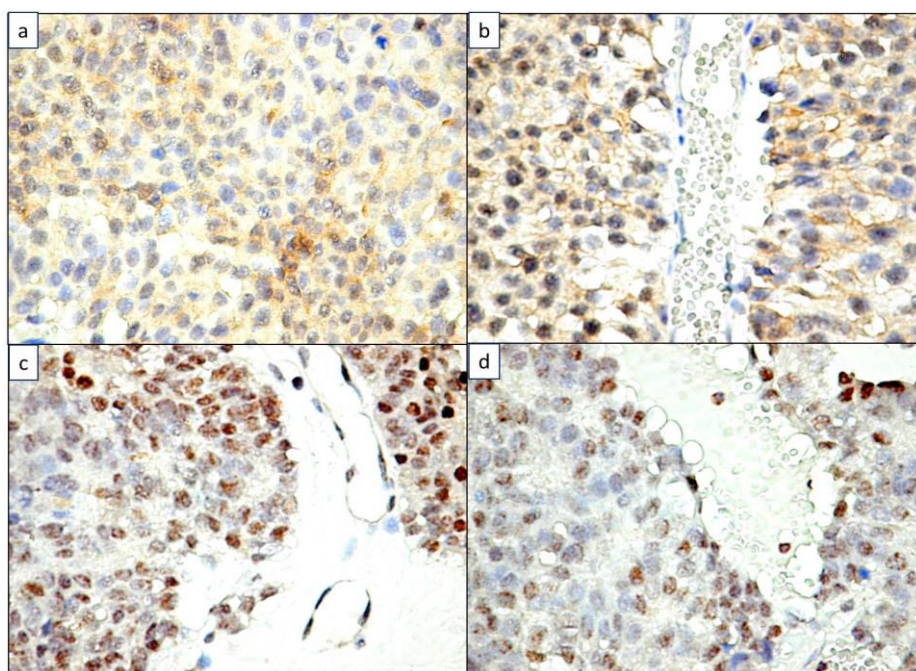


Fig.5.14. Expresia PDGF A în adenoamele hipofizare. Citoplasma celulelor tumorale a fost pozitivă pentru PDGF A (a). Pattern membranar observat predominant în celulele tumorale din jurul vaselor sanguine (b). Expresia nucleară s-a observat în celulele endoteliale și celulele tumorale (c). În cazuri izolate, celulele tumorale cu semnal pozitiv în nucleu au delimitat spații vasculare (d).

Expresia intensă, notată cu +3 a fost identificată în 62,5% din adenoamele hipofizare de tip compact și în 53,33% din adenoamele hipofizare de tip papilar. De remarcat că, pentru adenoamele hipofizare de tip papilar, s-a înregistrat doar o expresie moderată și intensă a PDGF A pentru toate cazurile incluse în studiu, comparativ cu cele de tip compact unde PDGF A s-a observat doar în 75% din cazuri.

PDGF A a avut o expresie heterogenă raportată la tipurile celulare care au intrat în componența adenoamelor hipofizare. 53,33% din adenoamele hipofizare de tip papilar PDGF A pozitive au fost constituite din celule bazofile, 35,71% au fost de tip acidofil iar restul au fost constituite din celule cromofobe cu sau fără arii mici de celule acidofile. În ceea ce privește profilul hormonal, 57,14 % din adenoamele papilare PDGF A+ au fost FSH secretante cu sau fără co-expresie de LH. Celelalte cazuri au fost secretante de ACTH sau PRL și, într-un singur caz am avut un profil plurihormonal de tipul GH-PRL-ACTH. Adenoamele hipofizare PRL secretante au fost de asemenea secretante de PDGF A, într-o proporție semnificativ statistică ($p=0,011$). În ciuda numărului mare de cazuri FSH secretante, corelația dintre secreția FSH și PDGF A nu a fost semnificativă.

Adenoamele PDGF A pozitive de tip compact au fost în majoritate de tip acidofil (87,5%). În cadrul acestora, au predominat în proporții egale, adenoamele plurihormonale și non secretante (37,5% fiecare), urmate de GH-PRL și cele FSH secretante (17% fiecare).

Supraexpresia EGFR și a VEGF s-a suprapus în cazul adenoamelor hipofizare PDGF A pozitive, astfel că am înregistrat un indice de $p=0,0445$, fapt susținut și de scatter plot-ul din Figura 5. 15 însoțit de datele statistice.

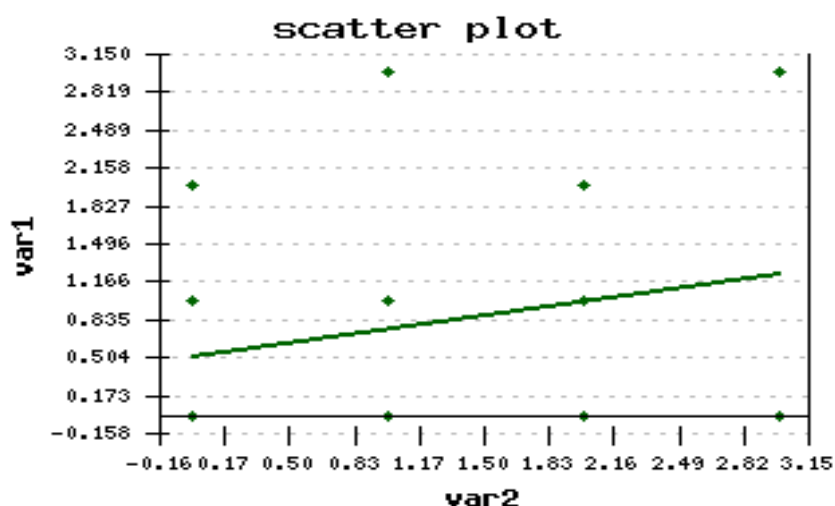


Fig.5.15. Analiza statistică a corelației dintre expresia VEGF (var2) și EGFR (var1) pentru cazurile de adenoame papilare PDGF A pozitive.

Pentru adenoamele hipofizare mixte, cu două componente PDGF A s-a exprimat diferit, fiind mai intensă în componenta cromofobă și slabă și focal distribuită în componenta compactă aspecte evidente în Figura 5.16.

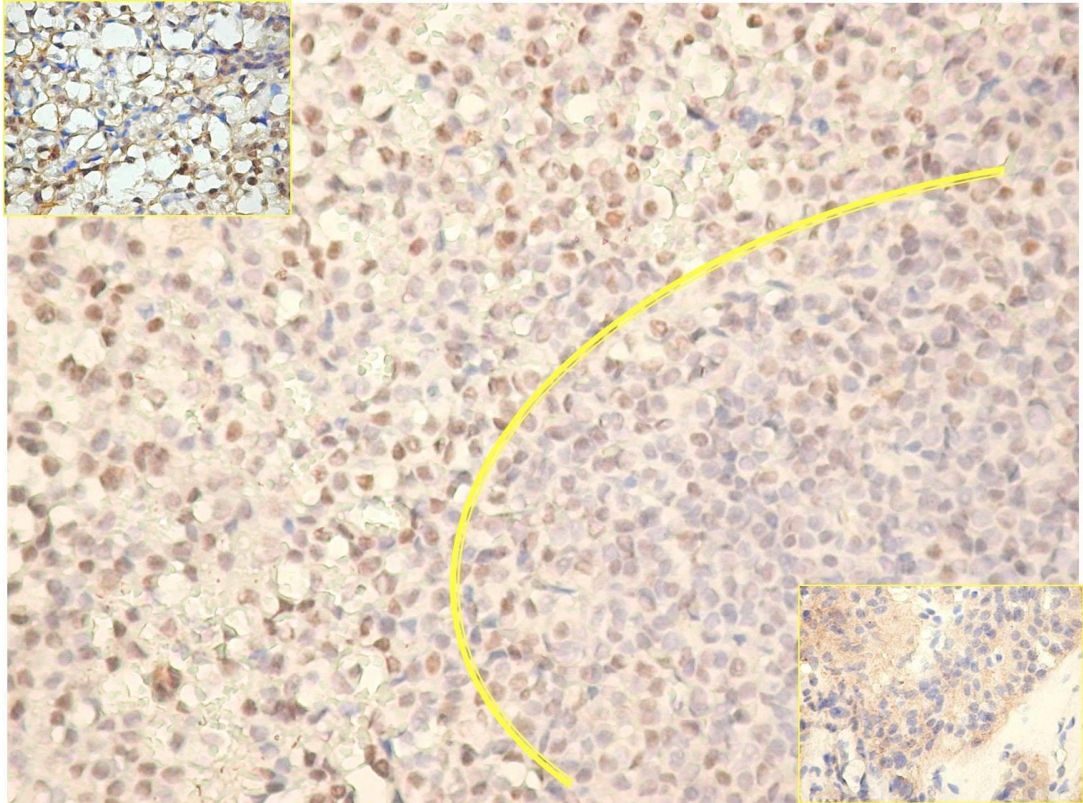


Fig. 5.16. Adenom hipofizar cu o componentă cromofobă (stânga, sus) și acidofilă (dreapta, jos), cu o expresie diferențiată a PDGF A, nuclear și citoplasmatic în aria cromofobă și predominant citoplasmatic în aria acidofilă

5.1.4. Axul PDGF B/PDGFR beta în adenoamele hipofizare

Spre deosebire de PDGF A unde expresiile membranară și citoplasmatică au predominat, pentru PDGF B, majoritatea cazurilor au prezentat o reacție nucleară pozitivă în celulele tumorale, combinată într-un număr mic de cazuri cu reacție citoplasmatică (Figura 5.17).

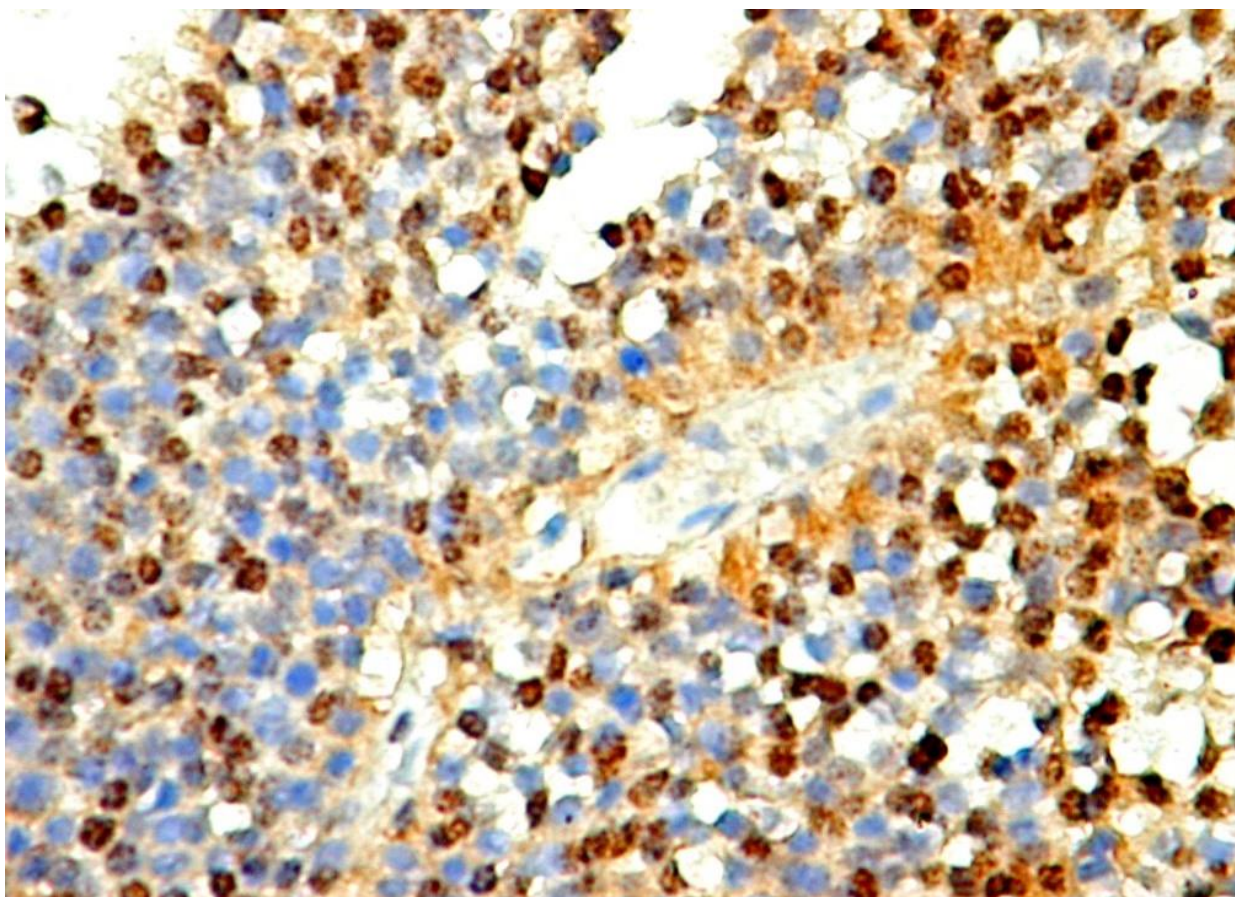


Fig.5.17. Heterogenitatea expresiei PDGF B în cadrul unui adenom hipofizar de tip papilar, unde se poate observa prezența celor trei tipuri de expresie: nucleară, citoplasmatică și membranară.

Procentul de cazuri pozitive a fost relativ similar cu cel obținut pentru PDGF A. Am obținut un procent de 68,33% din cazuri pozitive la PDGF B. Expresia nucleară nu a fost o reacție fals pozitivă, dat fiind faptul că, în același câmp microscopic am observat nuclei negativi la PDGF B mixați cu arii nucleare intens pozitive pentru PDGF B. Toate tipurile de adenoame hipofizare au fost pozitive pentru PDGF B [15].

Un aspect particular al expresiei PDGF B, a fost legat de evaluarea prezenței sale în nucleu, decelată prin imunohistochimie. Date precedente au raportat, în model experimental că

translocăția expresiei PDGF din citoplasmă în nucleu ar reprezenta de fapt, expresia unei mutații apărute în gena PDGF. Pornind de la acest precedent, am evaluat separat expresia PDGF B în nucleu și citoplasmă celulelor tumorale și am remarcat că, în 85% din cazurile incluse în studiu, expresia a fost limitată strict nuclear (Figura 18a). Restul de 15% au prezentat o reacție combinată, citoplasmatică și nucleară în celulele tumorale (Figura 5.18b).

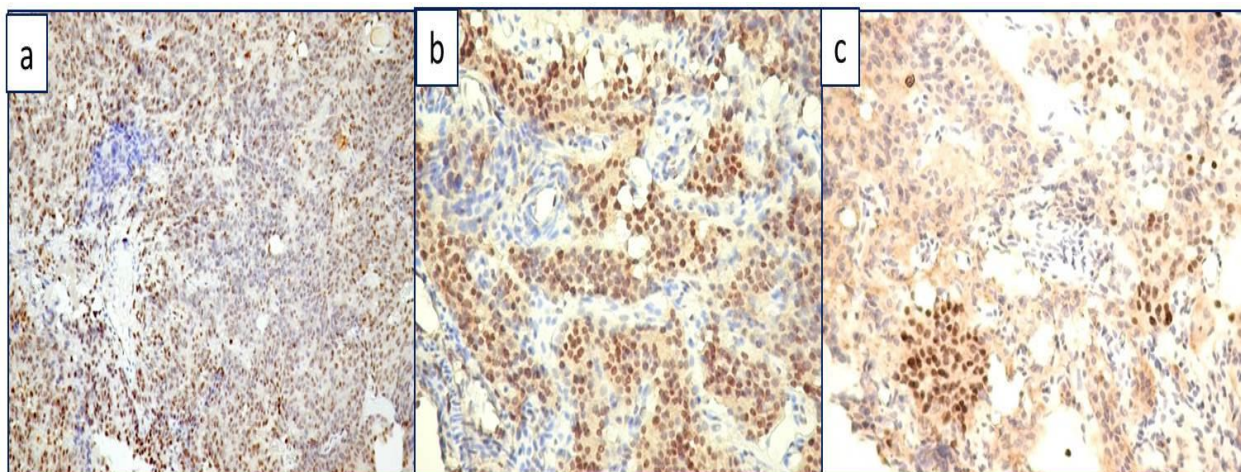


Fig.5.18. Expresia nucleară (a), nucleară și citoplasmatică (b) și focal nucleară/focal citoplasmatică (c) a PDGF B în adenoamele hipofizare.

Raportat la profilul hormonal, PDGF B a prezentat expresia notată cu scorul cel mai înalt (+3) în adenoamele GH secretante. Această supraexpresie a fost semnificativ statistică, pentru aceasta am obținut un $p=0.010$ pentru coeficientul Pearson, ceilalți coeficienți de corelație fiind de asemenea semnificativi (Figura 5.19).

Expresia intensă a PDGF B a necesitat evaluarea PDGFR β pentru a putea explica prezența mecanismului de acțiune autocrin a PDGF B în patogeneza adenoamelor hipofizare.

		PDGF B	GH			PDGF B	GH
PDGF B	Pearson Correlation	1.000	-.330	Kendall's tau_b	PDGF B	Correlation Coefficient	-.262
	Sig. (2-tailed)	.	.010			Sig. (2-tailed)	.022
	N	61	60			N	61
GH	Pearson Correlation	-.330	1.000	GH	Correlation Coefficient	-.262	1.000
	Sig. (2-tailed)	.010	.			Sig. (2-tailed)	.022
	N	60	60			N	60
				Spearman's rho	PDGF B	Correlation Coefficient	-.309
						Sig. (2-tailed)	.016
						N	61
				GH	Correlation Coefficient	-.309	1.000
						Sig. (2-tailed)	.016
						N	60

Fig.5.19. Analiza statistică a co expresiei GH și PDGF B în adenoamele hipofizare. A relevat o suprapunere semnificativ statistică

Dintre factorii de creștere sau receptorii pentru factorii de creștere, PDGF B a prezentat o corelație inversă semnificativă doar cu VEGF (Figura 5.20).

		VEGF	PDGF B
VEGF	Pearson Correlation	1.000	-.263
	Sig. (2-tailed)	.	.040
	N	61	61
PDGF B	Pearson Correlation	-.263	1.000
	Sig. (2-tailed)	.040	.
	N	61	61

Fig.5. 20. Corelația dintre expresia VEGF și PDGF B

PDGFR β mRNA a fost evaluat prin tehnica RNA scope. Ca și control al reacției de amplificare am utilizat expresia PDGFR β mRNA amplificată la nivelul celulelor perivasculare și a pericitelor capilarelor intratumorale și peritumorale. În acestea, reacția a fost intensă, amplificarea fiind notată cu un scor de 4 (Figura 5.21). Raportat la această expresie, am evaluat amplificarea genică în celulele tumorale.

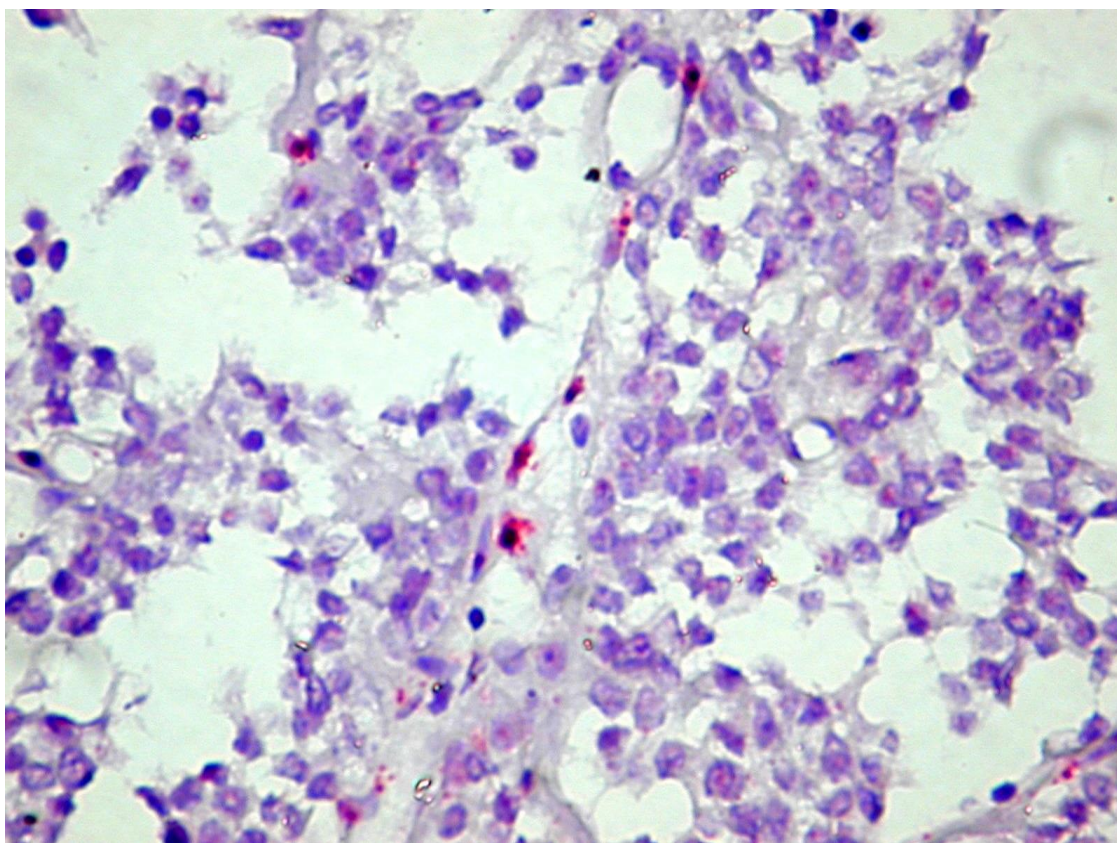


Fig. 5.21. Celule perivasculare cu amplificare crescută pentru PDGFR β mRNA evidențiată prin semnale punctiforme multiple cu localizare nucleară

Adenoamele hipofizare cu celule acidofile, majoritatea secretante de GH au prezentat amplificare pentru gena PDGFR β în celulele tumorale, însă amplificarea a fost extrem de heterogenă, variind de la o amplificare joasă (notată cu +1) la o amplificare înaltă (majoritatea cazurilor, +4).

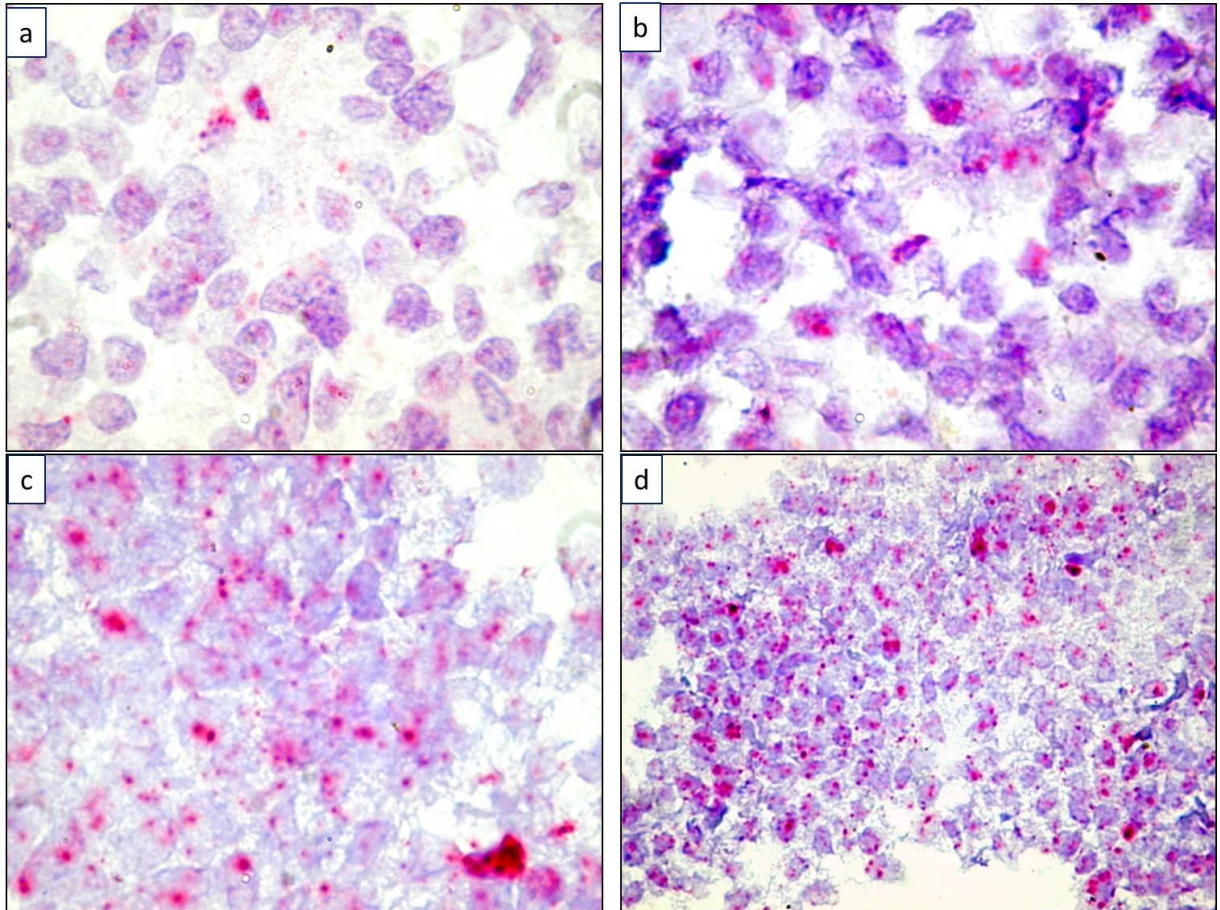


Fig. 5.22. Heterogenitatea de amplificare pentru PDGFR β în cazul adenomaleor hipofizare GH secretante, cu celule acidofile, notată cu +1 (a), +2 (b), +3 (c), +4 (d)

Un aspect particular, remarcat în cazul adenoamelor hipofizare GH secretante, s-a observat în apropierea vaselor sanguine. Peretele unora dintre vasele sanguine din adenoamele hipofizare cu o amplificare moderată, a fost discontinuu iar celulele tumorale acidofile din vecinătatea acestora, au prezentat a amplificare înaltă pentru PDGFR β mRNA, fiind dispuse în peretele vasului (Figura 5.23). Această distribuție poate sugera prezența mimetismului vasculogenic în adenoamele hipofizare, aspect remarcat și pe preparatele colorate cu hematoxilină eozină.

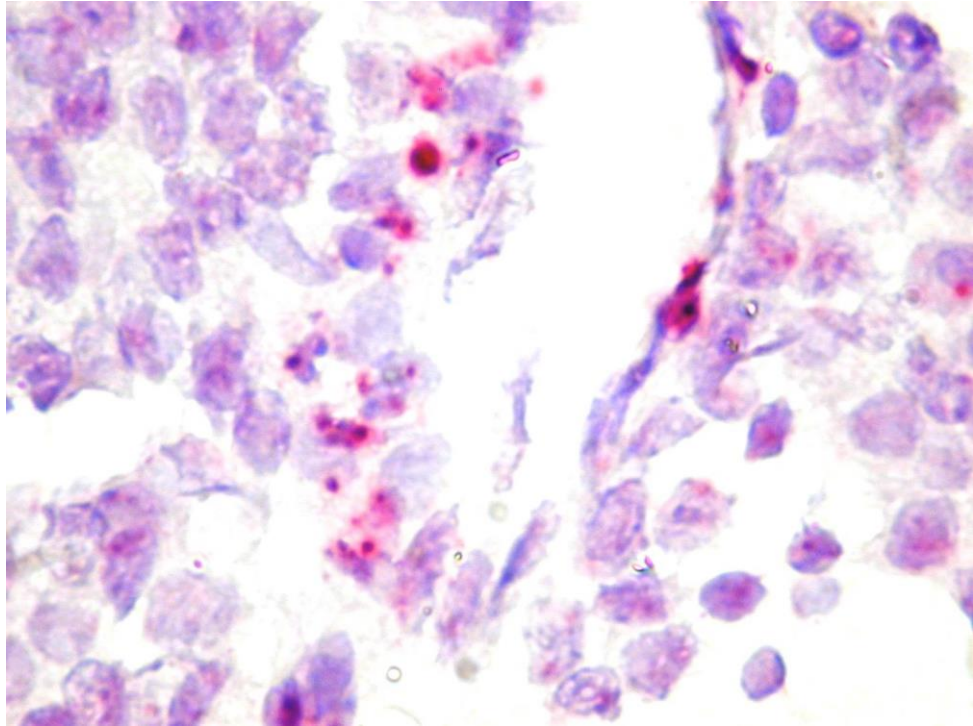


Fig. 5.23. Adenom hipofizar cu amplificare joasă pentru PDGFR β mRNA în aria tumorală dar cu vase cu perete discontinuu, delimitate pe de o parte de celule tumorale cu amplificare înaltă pentru PDGFR β (stânga) și de celule endoteliale (dreapta).

Pentru adenoamele hipofizare cu celule bazofile amplificarea pentru PDGFR β mRNA a fost prezentă dar moderată, notată cu +2 și inconstantă. Același pattern al amplificării s-a remarcat și în cazul adenoamelor cu celule cromofobe (Figura 5.24).

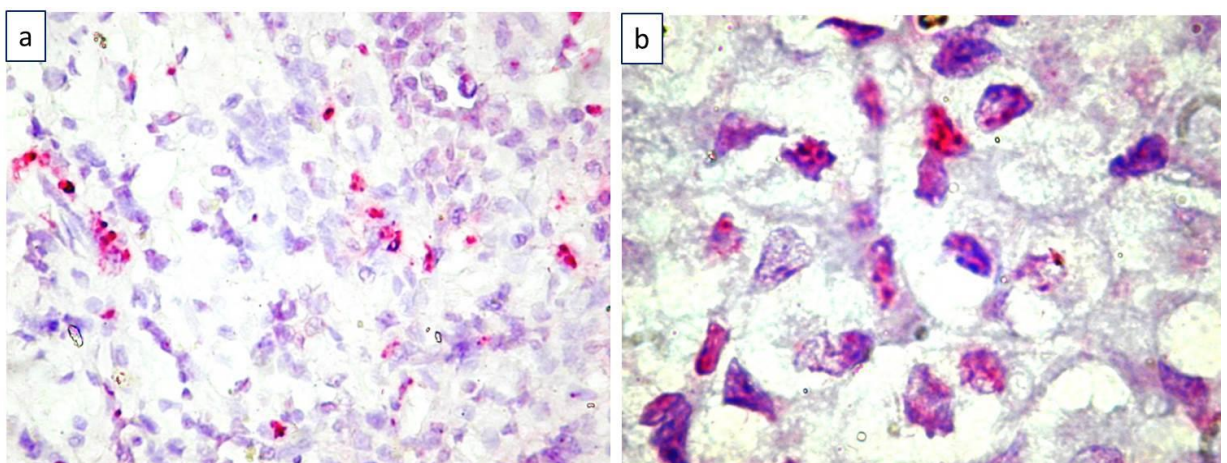


Fig. 5.24. Amplificare genică pentru PDGFR β mRNA în celulele tumorale ale adenoamelor hipofizare de tip bazofil (a) și cromofob (b).

Discuții. Expresia factorilor de creștere în adenoamele hipofizare pare să fie din ce în ce mai mult studiată în adenoamele hipofizare, cel mai probabil datorită faptului că, factorii de creștere și receptorii corespondenți reprezintă ținte terapeutice pentru o serie de agenți moderni dezvoltați și utilizați ca terapie personalizată într-o serie de afecțiuni maligne precum cancerul de colon cu metastaze [24], cancerul pulmonar [35], cancerul mamar [7] sau cel renal [235].

În cazul adenoamelor hipofizare, factorul de creștere al endoteliului vascular (VEGF) a fost cel mai intens studiat fiind un factor controversat din punct de vedere al implicării sale în procesul de angiogeneză tumorală în tumorile hipofizare.

Este certificat faptul că celulele tumorale din adenoamele hipofizare secretă VEGF în cantități variabile, supraexpresia sa fiind asociată extensivă supraselară și fiind considerată ca factor de prognostic nefavorabil [261, 275]. Pe baza datelor destul de reduse din literatură, referitoare la expresia, impactul prognostic și terapeutic al VEGF în adenoamele hipofizare, s-au realizat încercări de dezvoltare a unor terapii anti VEGF, altele decât cea bine cunoscută cu bevacizumab, mai mult sau mai puțin personalizate pentru adenoamele hipofizare. Viabilitatea celulelor tumorale din adenoamele hipofizare este susținută, cel mai probabil printr-un mecanism autocrin de sinteza a VEGF [262]. Acest fapt a fost demonstrat de inhibarea viabilității celulare prin administrarea de cabergoline care a inhibat receptorul pentru dopamină DR2 și, indirect secreția de VEGF [96]. Totuși, expresia receptorilor dopaminergici și raportul lor cu expresia VEGF, rămâne un subiect controversat în literatură, astfel că Wang și colaboratorii nu au găsit corelație între D2R și expresia VEGF [326] dar totuși au remarcat expresia crescută a VEGF în 58,9% din adenoamele hipofizare studiate. Rezultatele noastre sunt în acord cu datele din literatură dar procentul de cazuri VEGF pozitive este mult mai mare comparativ cu cel raportat de Wang, astfel că în studiul nostru, 77,4% din cazuri au prezentat o expresie crescută a VEGF evaluată prin imunohistochimie. Aceiași autori au precizat că mecanismul de acțiune al VEGF în patogeneza adenoamelor hipofizare este încă incomplet cunoscut, astfel că au încercat să cuantifice expresia VEGF în raport cu profilul hormonal al adenoamelor hipofizare. Autorii au observat o expresie crescută a VEGF în adenoamele GH și PRL secretante, la fel ca și datele pe care le-am obținut în studiul de față. Dacă în prezentul studiu, supraexpresia VEGF cu un scor de +2 și +3 a fost restricționată la adenoamele hipofizare GH și PRL secretante unde am raportat corelații semnificativ statistice, Wang și colaboratorii au găsit aceeași supra expresie și într-un procent relativ crescut de adenoame hipofizare FSH , ACTH și LH pozitive.

În adenoamele hipofizare GH secretante, VEGF este un factor de prognostic independent implicat în progresia și agresivitatea tumorală. Se pare că o terapie preoperatorie cu Octeotride

determină scăderea nivelelor de VEGF și îmbunătățește prognosticul pacienților cu adenoame hipofizare GH și VEGF secretante [339].

Implicarea VEGF în geneza adenoamelor hipofizare rămâne un subiect controversat. Supraexpresia VEGF în majoritatea adenoamelor hipofizare corelată cu o micro densitate vasculară scăzută în mod paradoxal, comparativ cu țesutul hipofizar normal, sugerează acțiunea VEGF, printr-un alt mecanism decât cel angiogenic în patogeneza tumorilor hipofizare. Este bine cunoscut faptul că, în adenoamele hipofizare supraexpresia VEGF, este însoțită în majoritatea cazurilor de supraexpresia de Endostatină, care ar putea explica astfel micro densitate vasculară scăzută din adenoamele hipofizare [108].

Expresia VEGF a fost heterogenă în grupul de adenoame hipofizare studiate în prezenta cercetare. Cele trei tipuri de expresie au fost difuz, focal și insular. Aspectul difuz a coincis cu adenoamele hipofizare GH și PRL secretante la care am obținut corelație semnificativ statistică între profilul hormonal și supraexpresia VEGF. Majoritatea datelor din literatură au prezentat rezultate similare cu cele găsite de noi. Pentru celelalte tipuri de adenoame hipofizare ACTH secretante există puține date despre expresia VEGF [217, 231] și, cu atât mai puțin date referitoare la pattern-ul de expresie. Toate articolele care vizează acest aspect sunt prezentări de caz care descriu cazuri clinice izolate tratate sau nu cu bevacizumab [231]. Pentru cazurile ACTH pozitive din studiul nostru, am observat un pattern de expresie particular al VEGF. Reacția pozitivă pentru VEGF a fost distribuită într-un aspect tipic „insular”, celulele VEGF pozitive fiind grupate de cele mai multe ori în jurul unui vas sanguin, grupurile pozitive fiind separate de arii negative pentru VEGF. O posibilă explicație a acestui pattern particular de expresie ar putea fi rata de proliferare foarte mare observată la peste 90 % din cazurile ACTH pozitive.

Creșterea rapidă a tumorii a determinat cel mai probabil, arii focale de hipoxie în care celulele tumorale activate au secretat VEGF ca răspuns la mecanismul hipoxic. Centrarea ariilor insulare VEGF pozitive de către vase sanguine sugerează implicarea VEGF atât în tumorigeneza adenoamelor hipofizare cât și în stimularea focală a angiogenezei în adenoamele ACTH și TSH secretante. Mai mult, prezența ariilor VEGF pozitive înalt proliferante pot fi asociate cu zone tumorale cu o capacitate crescută de invazie, responsabile cel mai probabil de recurențele repetate semnalate în adenoamele hipofizare ACTH secretante [133].

În majoritatea studiilor publicate în literatură, VEGF este cuantificat din punct de vedere al supraexpresiei sale dar, în prezent nu există o asociere a acesteia cu aspectul pattern-ului de creștere, morfologic sau cu distribuția acestei supraexpresii în aria tumorală din diferitele tipuri de adenoame hipofizare cu profil hormonal diferit.

Astfel, pe baza rezultatelor noastre putem considera, că supraexpresia VEGF a caracterizat pattern-urile de creștere papilar și solid [204]. Aparent caracterizate prin aceeași intensitate de expresie imunohistochimică, aplicarea metodei de detectare a VEGF mRNA a evidențiat diferențe de expresie genică prin prezența semnalelor distincte nucleare în pattern-ul solid versus clustere de amplificare în celulele tumorale din adenoamele hipofizare de tip papilar. Mai mult, aplicarea tehnicilor de *hibridizare in situ* pentru identificarea VEGF mRNA în adenoamele hipofizare este o metodă sensibilă, detectând nu doar amplificarea genică la nivelul celulelor tumorale, dar și în celulele endoteliale care participă la fenomenul de angiogeneză prin intususcepție observat în studiul nostru.

În prezent nu există date în literatură privind cuantificarea VEGF mRNA prin tehnica RNA scope pe țesuturi provenite din adenoamele hipofizare umane. Acest aspect poate fi considerat ca un element de originalitate al prezentei teze de abilitare, din acest motiv datele bibliografice sunt absente.

Celulele folicular stelate sunt recunoscute ca o sursă importantă de VEGF în țesutul hipofizar normal dar și în adenoamele hipofizare [105]. Implicarea celulelor foliculostelate în progresia tumorală are drept mecanism unanim acceptat secreția de VEGF cu rol mitogen asupra celulelor tumorale din adenoamele hipofizare [32]. După unii autori, celulele foliculostelate reprezintă principala sursă de VEGF în adenoamele hipofizare [108].

Aceste observații sunt în concordanță cu rezultatele noastre privind expresia proteică și a VEGF mRNA în celulele foliculostelate. Amplificarea genică a VEGF mRNA a înregistrat cea mai mare intensitate în celulele foliculostelate. Amplificare a fost observată în citoplasma și nucleul celulelor foliculostelate.

Datorită discrepanței dintre supraexpresia VEGF și numărul redus de vase de neoformație din adenoamele hipofizare precum și de faptul că mecanismul angiogenezei tumorale nu este pe deplin elucidat în aceste tipuri tumorale, am cuantificat expresia diferențiată a VEGF165b, fracțiunea inhibitorie a VEGF.

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 neoformație din aria tumorală. Totuși, în cazurile în care VEGF165b a fost supraexprimat, ariile pozitive au fost complet lipsite de vase sanguine, aspect care sugerează implicarea parțială a supraexpresiei VEGF165b în inhibarea angiogenezei tumorale mai ales în cazul adenoamelor hipofizare cu celule acidofile în care am înregistrat o supraexpresie a VEGF165b.

O particularitate a expresiei VEGF165b în adenoamele hipofizare a fost reprezentată de distribuția specifică perivasculară în jurul vaselor preexistente a celulelor tumorale VEGF165b pozitive. Această distribuție sugerează indirect inhibarea activării celulelor endoteliale și a inițierii angiogenezei tumorale ca o posibilă explicație a micro densității vasculare scăzute din adenoamele hipofizare. Numărul redus de cazuri VEGF165b pozitive sugerează și prezența altor mecanisme inhibitorii ale angiogenezei tumorale, cel mai probabil așa cum a fost deja descris în literatură prin prezența unei cantități semnificative de Endostatină [108].

În prezent în literatură există un singur articol în care Woolard și colaboratorii menționează prezența VEGF 165b în țesutul hipofizar fără a da informații despre expresia sa în adenoamele hipofizare [333].

Studiul de față, descrie pentru prima oară expresia VEGF165b și în alte tipuri celulare din structura adenoamelor hipofizare. Astfel, în cadrul adenoamelor hipofizare negative imunohistochemic pentru VEGF 165b, celulele stromale cu morfologie de macrofage sau mastocite au supraexprimat VEGF 165b. Un alt posibil mecanism de inhibare a angiogenezei tumorale în adenoamele hipofizare cu celule tumorale care nu supraexprimă VEGF 165b, ar putea fi explicat printr-o posibilă acumulare de macrofage VEGF 165b pozitive sau o infiltrare tumorală cu mastocite VEGF 165b pozitive [201].

Rezultatele de față, chiar în stadiul preliminar reprezintă un aspect de originalitate al prezentei teze de abilitare, reprezentând primul raport referitor la implicarea VEGF 165b în patogeneza adenoamelor hipofizare.

Alături de variatele izoforme stimulatorii sau inhibitorii ale VEGF, factorii de creștere derivați din plachetele sanguine (PDGFs și receptorii corespondenți, PDGFRs) au fost extrem de puțin abordați în adenoamele hipofizare.

În 1983, Sullivan descrie pentru prima dată influența PDGF asupra secreției de prolactină în celulele hipofizare din cultură [292]. Autorii au demonstrat că, PDGF acționează asupra celulelor tumorale ale adenoamelor hipofizare și determină inhibarea secreției de prolactină și stimularea secreției de GH. Rezultatele noastre certifică influența factorilor de creștere din familia PDGF asupra profilului hormonal și confirmă parțial aceste date în sensul că, cele două variante, PDGF A și PDGF B par să aibă un efect diferențiat raportat la profilul hormonal. Atât pentru PDGF A cât și pentru PDGF B procentul de cazuri pozitive a fost relativ similar, fiind cuprins între 66-68%.

Rezultatele noastre au demonstrat o predominanță a cazurilor PDGF A pozitive în grupul adenoamelor hipofizare FSH secretante cu sau fără co-expresie de LH ceea ce sugerează un rol

stimulator al PDGF A în secreția de FSH [15]. Contrar datelor prezentate de autorii menționați în studiul nostru PDGF A s-a corelat semnificativ statistic cu expresia PRL. În schimb, PDGF B a influențat supraexpresia GH, singura corelație semnificativă obținută în studiul nostru fiind doar între adenoamele hipofizare GH secretante și PDGF B aspect care confirmă de asemenea datele din literatură privind efectul stimulator al PDGF asupra secreției de GH.

Un aspect particular al expresiei PDGF A și B în adenoamele hipofizare a fost localizarea sa dublă, nucleară și citoplasmatică, cu predominanța celei nucleare. Translocarea expresiei citoplasmatică a PDGF în nucleu a fost descrisă anterior pentru celulele care erau modificate și conțineau oncoproteina *v-sis* o proteină de transport capabilă să realizeze translocarea PDGF din citoplasmă în nucleu. Caracterizată pentru prima oară de Deuel și colaboratorii în 1984 [71], gena *v-sis* determină inducția tumorigenezei și creșterea potențialului mitogen mediată de PDGF în celulele tumorale în care este prezentă [174, 287]. Procentul de 85% de adenoame hipofizare care au prezentat expresia nucleară a PDGF A dar mai ales al PDGF B susțin prezența translocăției nucleare a acestor factori de creștere, cel mai probabil prin activarea oncoproteinei *c-sis*, omologul uman al oncogenei *v-sis*.

Este bine cunoscut faptul că oncogenă *v-sis* și PDGF B prezintă 92% analogie din punct de vedere structural și doar 50% are o structură similară cu PDGF A [19]. Datele noastre confirmă această diferență de analogie, astfel că, în studiul nostru, PDGF A a avut o expresie predominant citoplasmatică și într-un număr extrem de redus de cazuri o expresie nucleară, în timp ce expresia PDGF B a fost predominant nucleară și în rare cazuri citoplasmatică sau combinată, citoplasmatică și nucleară. Aceste diferențe de expresie a celor doi factori susțin încă o dată în plus implicarea oncogenei *v-sis* în patogeneza adenoamelor hipofizare. În prezent nu există studii care să certifice implicarea acestei oncogene în dezvoltarea și progresarea adenoamelor hipofizare. Prin suprapunerea supraexpresiei PDGF B cu cea a receptorului corespondent PDGFR β studiul nostru susține implicarea axului PDGF B/ PDGFR β în patogeneza adenoamelor hipofizare.

Corelația semnificativ statistică obținută între expresia VEGF și a PDGF B în adenoamele hipofizare completată de suprapunerea expresiei imunohistochemice a celor doi factori perivascular sau în jurul structurilor care mimează spațiile vasculare (mimetism vasculogenic) sugerează o acțiune comună ce stimulează proliferarea celulelor tumorale și progresia adenoamelor hipofizare prin mecanisme complexe, incomplet elucidate până în prezent.

5.2. Expresia si semnificația prognostică a EG VEGF în adenoamele hipofizare

Motivație. Factorul de creștere al endoteliului vascular derivat din glandele endocrine (EG VEGF) este bine cunoscut ca fiind exprimat în placentă în primul trimestru de sarcină [1] și ca având un rol proangiogenic în diferite organe ce conțin țesuturi cu rol endocrin precum ovarul, testiculul, sau suprarenala [27, 188]. Ca un paradox, expresia EG VEGF în hipofiza normală și adenoamele hipofizare corespondente este foarte puțin studiată. În prezent, un singur articol a raportat expresia EG VEGF în hipofiza normal și izolat în adenoamele hipofizare, legat doar de profilul hormonal al acestora. Alte interacțiuni cu factorii de prognostic cunoscuți din adenoamele hipofizare precum indicele de proliferare al celulelor tumorale sau factorii de creștere implicați în patogeneza adenoamelor hipofizare n-au fost studiate. Datele izolate privind expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare precum și lipsa informației referitoare la rolul prognostic al acestuia în adenoamele hipofizare au reprezentat o motivație puternică pentru evaluarea EG VEGF în studiul de față pentru identificarea particularităților de expresie și a rolului prognostic.

Rezultate. Mai mult de jumătate din numărul total de cazuri (64%) au prezentat o reacție moderată și intensă, notată cu +2 respectiv +3 pentru EG VEGF. La acest procent, s-au mai adăugat 15% din cazuri, notate cu +1 în care am observat celule sau grupuri mici de celule pozitive la EG VEGF, motiv pentru care, acestea au fost incluse în lotul de cazuri negative, astfel că, le-am considerat ca fiind negative un procent de 36% din cazuri.

Hipofiza normală a prezentat o reacție pozitivă pentru EG VEGF (Figura 5.25a), cu pattern granular citoplasmatic și cu expresie heterogenă nu doar de la o celulă la alta dar și în cadrul aceluiași tip celular. Astfel, expresia EG VEGF a fost observată în celulele acidofile și cromofobe și a fost absentă în celulele bazofile (Figura 5.25b, c, d). În celulele acidofile, expresia EG VEGF a înregistrat două pattern-uri. Expresia granulară a fost distribuită omogen (fig 5.25b) sau a fost heterogenă, cu intensificare sub membrana celulară (Figura 5.25c). Intensitatea expresiei în celulele cromofobe a fost moderată comparativ cu cea din celulele acidofile și omogenă, nefiind observat pattern-ul granular (Figura 5.25d).

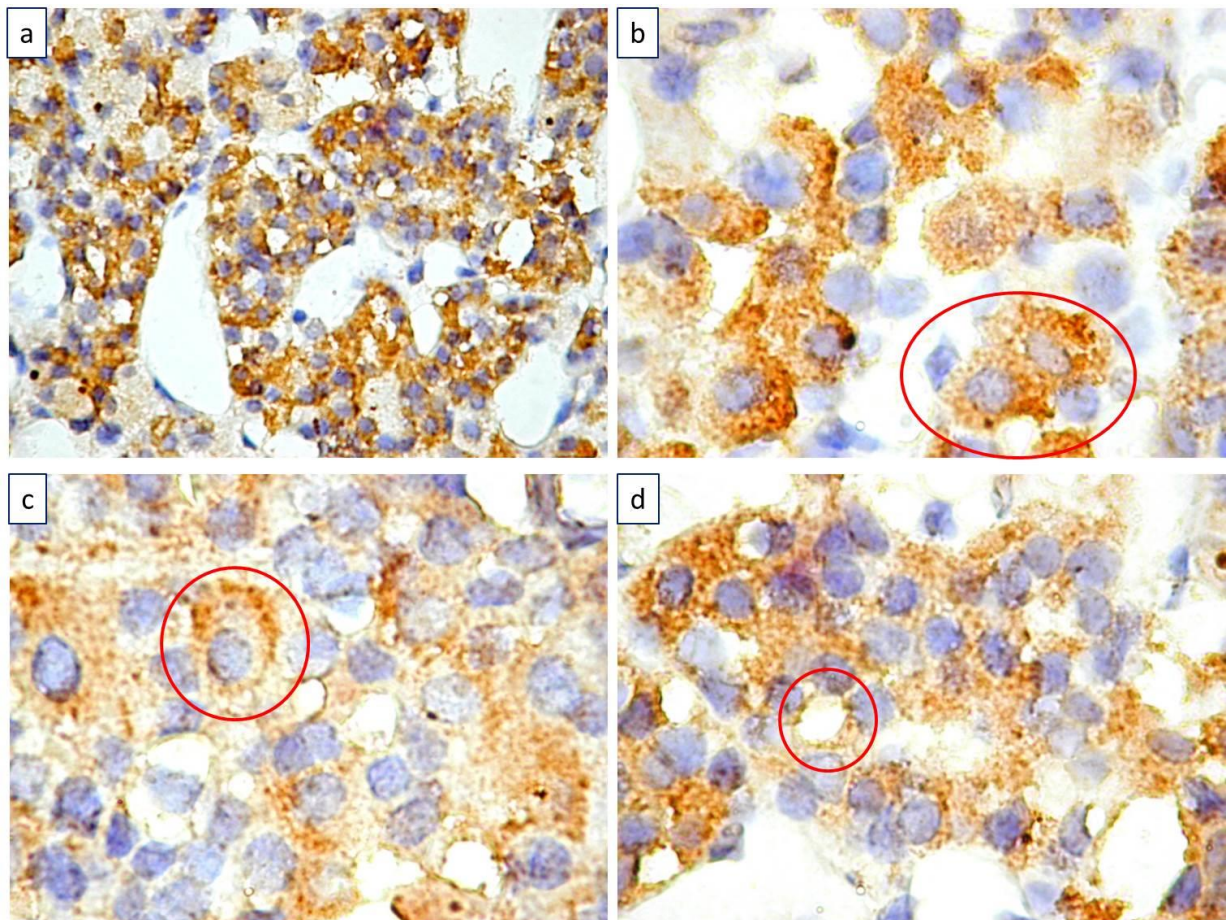


Fig. 5.25. Expresia și distribuția EG VEGF în hipofiza normală (a). Aspect citoplasmatic, granular, omogen distribuit în toată aria celulară a celulelor acidofile (b), sau heterogen, cu intensificare în citoplasma imediat adiacentă membranei celulare (c). Celulele cromofobe au avut o expresie moderată a EG VEGF iar pattern-ul granular a fost mai puțin evident (d).

Pattern-ul compact a caracterizat 32,6% din cazurile pozitive la EG VEGF, fiind secundat, într-un procent inferior de pattern-ul papilar (28,26%). Adenoamele hipofizare de tip mixt, dar în care a predominat componenta cromofobă au reprezentat 19,56% din cazurile de adenoame hipofizare pozitive la EG VEGF. Restul adenoamelor hipofizare care au exprimat EG VEGF au fost de tip trabecular, alveolar sau fusiform.

În grupul adenoamelor hipofizare de tip compact secretante de EG VEGF, 60% au inclus în profilul hormonal secreția de GH notată cu +2 și +3 dar, nu am înregistrat o corelație semnificativ statistică între expresia GH și cea a EG VEGF ($p=0.146$), cel mai probabil datorită faptului că, 30% din cazurile de adenoame hipofizare de tip compact au prezentat un profil plurihormonal. Nici un alt hormon din profilul adenoamelor hipofizare nu s-a corelat cu supraexpresia EG VEGF.

În schimb, pentru adenoamele hipofizare de tip compact, expresia EG VEGF s-a corelat semnificativ statistic cu cea a EGFR (Figura 5.26).

						EG VEGF		EGFR	
EG VEGF	Pearson Correlation	EG VEGF	EGFR	Kendall's tau_b	EG VEGF	Correlation Coefficient	1.000	.579*	
	Sig. (2-tailed)					Sig. (2-tailed)	.	.016	
	N	15	15			N	15	15	
EGFR	Pearson Correlation	.631*	1		Spearman's rho	EG VEGF	Correlation Coefficient	1.000	.631*
	Sig. (2-tailed)	.012					Sig. (2-tailed)	.	.012
	N	15	15				N	15	15
				EGFR		Correlation Coefficient	.631*	1.000	
						Sig. (2-tailed)	.012	.	
						N	15	15	

Fig. 5.26. Analiza statistică a corelației dintre EG VEGF și expresia EGFR în adenoamele hipofizare de tip compact.

Adenoamele de tip papilar au prezentat o reacție intensă la EG VEGF, care a fost observată în 70% din cazuri. Reacția a fost omogenă (Figura 5,27), fiind prezentă în toată aria tumorală, axul papilar fiind negativ (Figura 5.27).

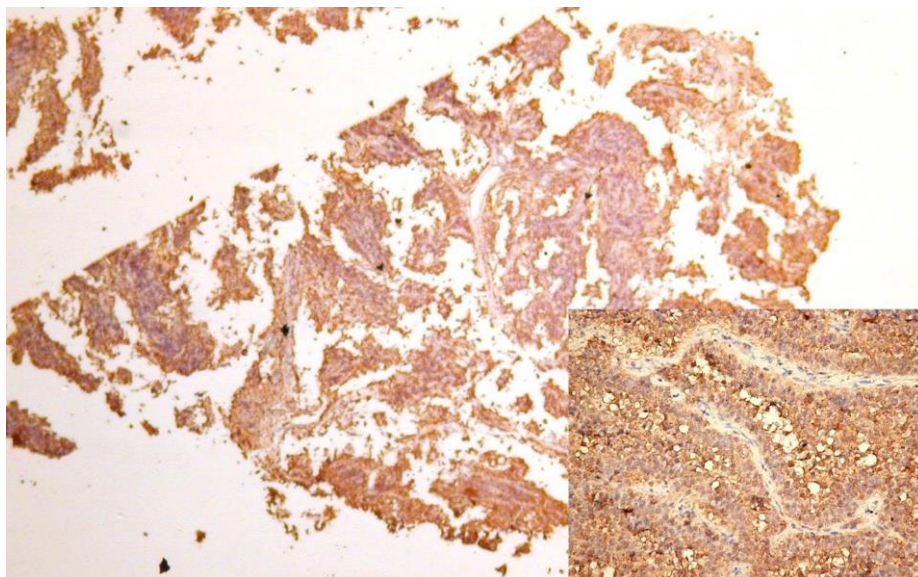


Fig.5.27. Adenom hipofizar de tip papilar cu o expresie intensă pentru EG VEGF în componenta epitelială. De remarcat că, toate celulele componente sunt pozitive pentru EG VEGF, reacția fiind intensă și omogenă, notată cu +3.

Ca și în cazul adenoamelor hipofizare de tip compact, am analizat raportul dintre profilul hormonal, expresia factorilor de creștere, indicele de proliferare și expresia S100 și a GFAP și expresia EG VEGF. EGFR nu s-a corelat cu expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare de tip papilar, singurul parametru semnificativ statistic corelat cu EG VEGF fiind PRL (Figura 5.28).

						EG VEGF		PRL	
EG VEGF	Pearson Correlation	EG VEGF	PRL	Kendall's tau_b	EG VEGF	Correlation Coefficient	1.000	.568*	
	Sig. (2-tailed)					Sig. (2-tailed)	.	.035	
	N	13	13			N	13	13	
PRL	Pearson Correlation	.615*	1		Spearman's rho	PRL	Correlation Coefficient	.568*	1.000
	Sig. (2-tailed)	.025					Sig. (2-tailed)	.035	.
	N	13	13				N	13	13
				EG VEGF		Correlation Coefficient	1.000	.610*	
						Sig. (2-tailed)	.	.027	
						N	13	13	
				PRL	Correlation Coefficient	.610*	1.000		
					Sig. (2-tailed)	.027	.		
					N	13	13		

Fig.5.28. Analiza statistică a corelației dintre EG VEGF și PRL în adenoamele hipofizare de tip papilar.

Toate adenoamele hipofizare de tip mixt au avut o componentă cromofobă care, în toate cazurile a fost intens pozitivă pentru EG VEGF (Figura 5.29a). Componenta bazofilă a adenoamelor hipofizare de tip mixt a respectat pattern-ul de expresie al EG VEGF observat pentru celulele bazofile din hipofiza normală, fiind negative sau slab pozitive pentru EG VEGF (Figura 5.29b).

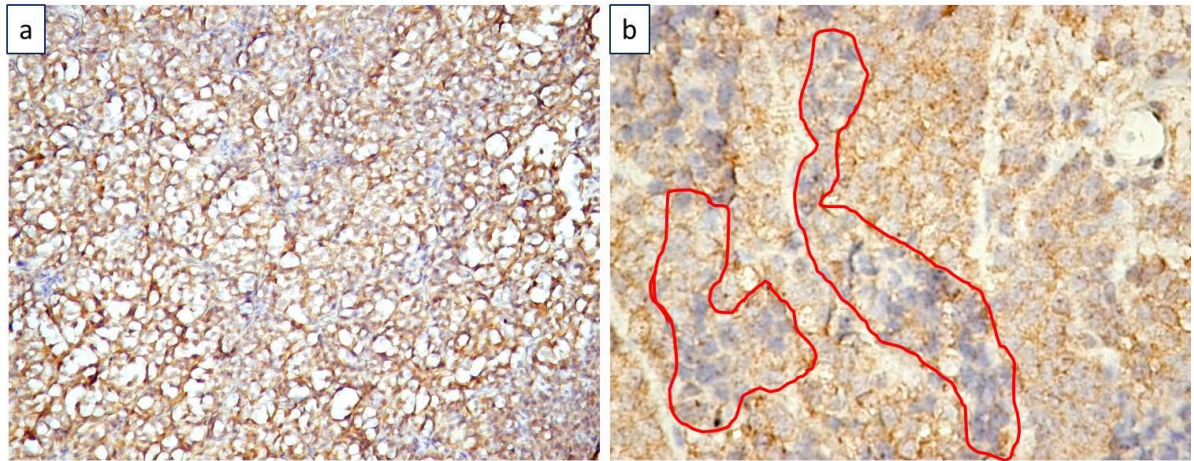


Fig. 5.29. Expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare mixte cu o componentă cromofobă (a) și absența expresiei în componenta bazofilă (b, cadrane delimitate de linia roșie).

Ca tipuri celulare, în 40,54% din cazuri am întâlnit adenoame hipofizare de tip cromofob sau mixt, dar în care ariile cromofobe erau predominante. Adenoamele hipofizare cu celule acidofile au fost regăsite în 48,7% din cazuri. Restul cazurilor au fost adenoame hipofizare de tip bazofil (Figura 5.30).

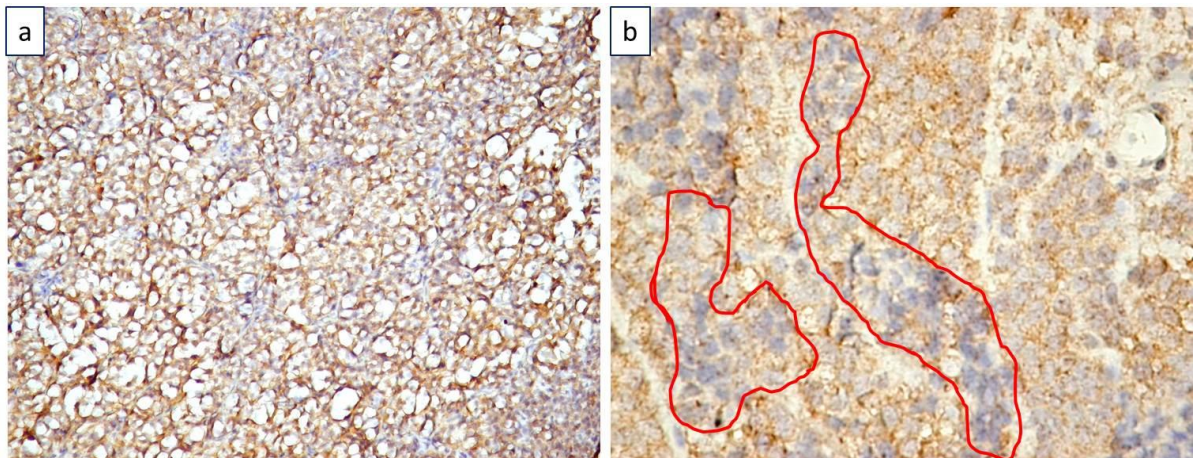


Fig. 5.30. Expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare mixte cu o componentă cromofobă (a) și absența expresiei în componenta bazofilă (b, cadrane delimitate de linia roșie).

Co-expresia cea mai frecvent întâlnită în cazul profilului hormonal al adenoamelor hipofizare de tip mixt a fost cea a expresiei GH-PRL dar singurul hormon care s-a corelat direct cu expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare de tip mixt a fost LH, care a înregistrat o valoare semnificativ statistică (Figura 5.31).

		EG VEGF	LH
EG VEGF	Pearson Correlation	1	-.800*
	Sig. (1-tailed)		.028
	N	6	6
LH	Pearson Correlation	-.800*	1
	Sig. (1-tailed)	.028	
	N	6	6

Fig.5. 31. Corelație directă, semnificativ statistică între expresia EG VEGF și LH în adenoamele hipofizare de tip mixt cu component predominant cromofobă.

Adenoamele hipofizare cu celule acidofile au fost notate cu o expresie a EG VEGF de +2 și +3 în 65,38% din cazuri. Nici unul din hormonii care alcătuiesc profilul hormonal al adenoamelor cu celule acidofile nu pare să fie influențat de supraexpresia EG VEGF, datorită lipsei de corelație care a rezultat din studiul nostru. În schimb, câteva aspecte cu posibile implicații prognostice, au fost sesizate după ce am corelat și ceilalți parametrii cu expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare cu celule acidofile. Astfel, proteina S100 a avut o corelație semnificativ statistică foarte puternică, cu expresia EG VEGF, pentru această asocieră am înregistrat un $p=0.007$ (Figura 5.32a). Co expresia EG VEGF cu GFAP a fost de asemenea semnificativă statistic ($p=0.05$, Figura 5.32b). Dintre factorii de creștere incluși în studiul de față, EGFR s-a coexprimat cu EG VEGF în majoritatea cazurilor, pentru această asocieră având un $p=0.028$, de asemenea semnificativ statistic (Figura 5.31c). Ceilalți parametrii, respectiv VEGF, HER2, PDGF A și PDGF B nu au prezentat o co-expresie semnificativ statistică cu EG VEGF. Rezultatele noastre au arătat faptul că, EG VEGF pare să aibă o implicare în proliferarea celulelor tumorale din adenoamele hipofizare, fapt susținut de corelația semnificativ statistică obținută între expresia EG VEGF și indicele de proliferare Ki67, pentru care s-a obținut un $p=0,042$.

a				b				c			
		EGVEGF	S100			EGVEGF	GFAP			EGVEGF	EGFR
EGVEGF	Pearson	1	.520**	EGVEGF	Pearson	1	-.389*	EGVEGF	Pearson	1	.431*
	Correlation				Correlation				Correlation		
	Sig. (2-tailed)		.007		Sig. (2-tailed)		.050		Sig. (2-tailed)		.028
	N	26	26		N	26	26		N	26	26
S100	Pearson	.520**	1	GFAP	Pearson	-.389*	1	EGFR	Pearson	.431*	1
	Correlation				Correlation				Correlation		
	Sig. (2-tailed)	.007			Sig. (2-tailed)	.050			Sig. (2-tailed)	.028	
	N	26	26		N	26	26		N	26	26

Fig.5. 32. Corelațiile semnificativ statistice dintre expresia EG VEGF și expresia proteinei S100 (a), GFAP (b) și EGFR (c) în adenoamele hipofizare cu celule acidofile.

Adenoamele hipofizare cu celule bazofile au fost pozitive cu intensitate moderată și mare în 45,45% din totalul cazurilor de adenoame cu celule bazofile. Toate cazurile de adenoame hipofizare cu celule bazofile EG VEGF pozitive au avut un pattern papilar. Cel mai important aspect pe care l-am observat în cazul adenoamelor cu celule bazofile a fost corelația semnificativ statistică a expresiei EG VEGF cu expresia PDGF A și PDGF B, aspect care nu au mai fost întâlnite pentru nici un alt tip morfologic (Figura 5. 33).

EGVEGF				EGVEGF				EGVEGF				EGVEGF											
		EGVEGF	PDGFA			EGVEGF	PDGFB			EGVEGF	PDGFB			EGVEGF	PDGFB								
EGVEGF	Pearson	1	.570*	EGVEGF	Pearson	1	.692*	EGVEGF	Pearson	1	.692*	EGVEGF	Pearson	1	.692*								
	Correlation				Correlation				Correlation				Correlation			Correlation							
	Sig. (1-tailed)		.033		Sig. (1-tailed)		.018		Sig. (2-tailed)		.018		Sig. (2-tailed)		.018	Sig. (2-tailed)		.018					
	N	11	11		N	11	11		N	11	11		N	11	11								
PDGFA	Pearson	.570*	1	PDGFB	Pearson	.692*	1	PDGFB	Pearson	.692*	1	PDGFB	Pearson	.692*	1								
	Correlation				Correlation				Correlation				Correlation			Correlation							
	Sig. (1-tailed)	.033			Sig. (2-tailed)	.018			Sig. (2-tailed)	.018			Sig. (2-tailed)	.018		Sig. (2-tailed)	.018						
	N	11	11		N	11	11		N	11	11		N	11	11								
Kendall's tau_b	EGVEGF	Correlation	1.000	.612*	Kendall's tau_b	EGVEGF	Correlation	1.000	.705*	Kendall's tau_b	EGVEGF	Correlation	1.000	.773**	Kendall's tau_b	EGVEGF	Correlation	1.000	.773**				
		Coefficient					Coefficient					Coefficient					Coefficient			Coefficient			
		Sig. (1-tailed)		.018			Sig. (2-tailed)		.015			Sig. (2-tailed)		.015			Sig. (2-tailed)		.005	Sig. (2-tailed)		.005	
	N	11	11	N		11	11	N	11		11	N	11	11		N	11	11					
	PDGFA	Correlation	.612*	1.000		PDGFB	Correlation	.705*	1.000		PDGFB	Correlation	.705*	1.000		PDGFB	Correlation	.773**	1.000	PDGFB	Correlation	.773**	1.000
		Coefficient					Coefficient					Coefficient					Coefficient				Coefficient		
Sig. (1-tailed)		.018		Sig. (2-tailed)	.015			Sig. (2-tailed)	.015			Sig. (2-tailed)	.005		Sig. (2-tailed)		.005						
N	11	11	N	11	11	N	11	11	N	11	11	N	11	11	N	11	11						
Spearman's rho	EGVEGF	Correlation	1.000	.660*	Spearman's rho	EGVEGF	Correlation	1.000	.773**	Spearman's rho	EGVEGF	Correlation	1.000	.773**	Spearman's rho	EGVEGF	Correlation	1.000	.773**				
		Coefficient					Coefficient					Coefficient					Coefficient			Coefficient			
		Sig. (1-tailed)		.014			Sig. (2-tailed)		.005			Sig. (2-tailed)		.005			Sig. (2-tailed)		.005	Sig. (2-tailed)		.005	
	N	11	11	N		11	11	N	11		11	N	11	11		N	11	11					
	PDGFA	Correlation	.660*	1.000		PDGFB	Correlation	.773**	1.000		PDGFB	Correlation	.773**	1.000		PDGFB	Correlation	.773**	1.000				
		Coefficient					Coefficient					Coefficient					Coefficient			Coefficient			
Sig. (1-tailed)		.014		Sig. (2-tailed)	.005			Sig. (2-tailed)	.005			Sig. (2-tailed)	.005		Sig. (2-tailed)		.005						
N	11	11	N	11	11	N	11	11	N	11	11	N	11	11									

Fig.5.33. Corelația dintre EG VEGF și PDGFs în adenoamele cu celule bazofile

Discuții. Factorul de creștere al endoteliului vascular derivat din glandele endocrine (EG VEGF), cunoscut și sub denumirea de Prokineticin1 este certificat ca un puternic mitogen al celulelor endoteliale precum și ca un factor implicat în tumorigeneza diferitor organe cu rol endocrin cum ar fi pancreasul, [216] ovarul [16] sau glanda pituitară [256, 334]. Expresia sa în hipofiza normală a fost raportată în foarte puține articole, iar prezența sa în adenoamele hipofizare doar într-o singură publicație [256]. Prezentul studiu a demonstrat expresia diferențiată a EG VEGF în hipofiza normală, astfel că celulele acidofile și cromofobe au fost intens pozitive pentru EG VEGF în timp ce în celulele bazofile EG VEGF a fost negativ. Acțiunea EG VEGF asupra celulelor endoteliale cu rol major în formarea fenestrațiilor specifice este unanim acceptată astăzi [171] însă rolul său în dezvoltarea și progresia adenoamelor hipofizare este incomplet elucidat.

Recunoscut ca fiind supraexprimat într-o varietate de tumori maligne cu origine gastrointestinală [102], pancreatică, [144] ovariană [346] sau de colon [103, 199, 294], EG VEGF pare să fie responsabil de invazia și metastazarea tumorală și, de asemenea, de controlul ratei de proliferare a celulelor maligne [177, 260].

Studiile anterioare pentru EG VEGF în adenoamele hipofizare au raportat o scădere a expresiei sale în adenoamele hipofizare comparativ cu hipofiza normală. Rezultatele noastre contrazic parțial datele deja publicate. Am obținut o supraexpresie a EG VEGF în peste jumătate din cazuri și, mai mult, am remarcat predominanța pattern-urilor solid-acidofil și a celui papilar acidofil sau bazofil. Aceste patternuri, în care EG VEGF a fost supraexprimat, sunt aparent neimportante din punct de vedere prognostic și terapeutic însă, fiecare dintre ele au avut un profil aparte al expresiei celorlalți markeri studiați în raport cu EG VEGF. Adenoamele hipofizare compacte cu celule acidofile au supraexprimat EG VEGF, această supraexpresie corelându-se semnificativ cu supraexpresia EGFR. Interacțiunea dintre EG VEGF și EGFR a fost menționată anterior doar în modificările placentare responsabile de pierderile de sarcină [69, 322]. Se pare că EG VEGF stimulează fosforilarea EGFR și activarea sa [69] și, astfel, protejează celulele tumorale de apoptoză. În studiul nostru s-a demonstrat pentru prima oară corelația dintre EG VEGF și EGFR într-un anumit tip morfopatologic de adenoame hipofizare, în special în cele compacte acidofile. De asemenea, pe baza rezultatelor noastre putem afirma că, expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare de tip compact acidofil nu este influențată de profilul hormonal.

Mai mult, absența corelației dintre EG VEGF și EGFR în adenoamele hipofizare de tip papilar, sugerează un profil molecular diferit al adenoamelor hipofizare. În adenoamele hipofizare de tip papilar EG VEGF s-a corelat cu expresia PRL. Date sumare despre

interacțiunea EG VEGF și nivelul seric de prolactină se regăsesc în literatură dar nu descrie pentru adenoamele hipofizare ci corelate cu diagnosticul diferențial al hipogonadismului [2]. În aceste studii, scăderea nivelelor serice ale prolactinei se datorau mutațiilor genice ale prokineticinelor. Atât EG VEGF cât și PRL sunt recunoscuți ca factori cu rol proliferativ asupra celulelor asupra cărora acționează. În studiul nostru, adenoamele hipofizare cu celule acidofile, dintre care o mare parte erau pozitive pentru PRL, au avut o supraexpresie a EG VEGF și, în același timp un indice ridicat de proliferare, corelat semnificativ statistic cu expresia EG VEGF. Astfel, se poate afirma că EG VEGF și PRL au o acțiune sinergică asupra ratei de proliferare a celulelor tumorale și sunt implicate în creșterea exponențială a tumorii.

Comparativ cu celulele bazofile din hipofiza normală care au fost negative pentru EG VEGF, celulele bazofile din adenoamele hipofizare au exprimat EG VEGF într-o proporție relativ crescută. Pattern-ul papilar a fost singurul pattern de creștere care a fost identificat pentru adenoamele hipofizare cu celule bazofile EG VEGF pozitive. Datele din literatură susțin implicarea EG VEGF în determinarea pattern-ului papilar de creștere al tumorilor din alte glande endocrine ca tiroida [237] și mai mult, prezintă mutații de tip BRAF ceea ce determină un comportament agresiv manifestat prin creșterea capacității infiltrative a tumorii și apariția metastazelor limfonodale. Mai mult, adenoamele hipofizare cu celule bazofile care au exprimat EG VEGF, au fost pozitive pentru PDGF A și B, corelația dintre cei trei factori fiind semnificativ statistică, mai puternică pentru PDGF B. Cei doi factori din familia PDGFs sunt de asemenea studiați și recunoscuți ca fiind implicați în patogeneza carcinoamelor tiroidiene cu aspect papilar [323, 325, 345] care au un prognostic nefavorabil.

Ca și în studiile precedente [256] în studiul de față am găsit o corelație semnificativ statistică între supraexpresia EG VEGF și expresia LH. Un singur articol menționează corelația dintre cei doi markeri în adenoamele hipofizare, celelalte studii care au raportat aceiași observație fiind realizate în contextul identificării de biomarkeri implicați în fertilizare și implantare [113].

Corelațiile semnificativ statistice pe care le-am obținut între expresia EG VEGF și expresia GFAP și a proteinei S100 sugerează un posibil rol al EG VEGF asupra reactivității celulelor foliculostelate în adenoamele hipofizare. Nu există în prezent date care să ateste sinteza EG VEGF în celulele folicular stelate din adenoamele hipofizare și nici date care să susțină acțiunea EG VEGF asupra celulelor folicular stelate din hipofiza normală și adenomatoasă.

5.3. Proteina HER2 și EGFR ca potențiali factori de prognostic și terapie pentru adenoamele hipofizare

Motivație. Factorii de prognostic și cei care sunt utili pentru stabilirea unei terapii țintite reprezintă aspecte importante ale evaluării diagnostice în tumorile benigne și maligne. Tendința actuală de a aplica terapia personalizată pentru fiecare pacient în parte dependent de profilul molecular al tumorii stimulează cercetarea, descrierea și utilizarea unor noi ținte terapeutice cu înaltă sensibilitate și specificitate pentru care se dezvoltă ulterior terapii țintite. Proteina HER 2 (erbB-2), face parte din categoria receptorilor tirozinkinazici, fiind receptorul 2 pentru factorul de creștere epidermal [48]. Amplificarea sau supraexpresia sa este rar întâlnită în țesuturile normale dar este prezentă în dezvoltarea și progresia diferitelor tipuri de tumori maligne (mamar, colon, gastrice) fiind, din acest motiv considerat ca un factor de prognostic nefavorabil pentru apariția metastazelor și ca un factor de agresivitate tumorală. HER 2 este deja acceptat de Food and Drug Administration și utilizat ca țintă terapeutică pentru tratamentul cu anticorpi monoclonali umanizați de tip trastuzumab în cancerul mamar cu metastaze. Pentru cancerul gastric, expresia Her2 este unanim acceptată, dar interpretarea și evaluarea expresiei sale sunt încă foarte controversate, din acest motiv, terapia cu trastuzumab nu este aprobată pentru aplicarea clinică. Un alt receptor pentru EGF, recunoscut ca țintă terapeutică și ca factor de prognostic în tumorile maligne este reprezentat de EGFR sau HER 1. Identificarea sa ca și oncogenă a condus la dezvoltarea de terapii țintite de tip gefitinib și erlotinib aplicate în cancerul pulmonar și cetuximab folosit în cancerul de colon. În adenoamele hipofizare, expresia HER1 și HER2 este sporadic studiată datele din literatură raportând în majoritatea cazurilor rezultate derivate din modelele experimentale *in vitro* sau *in vivo*. Cu excepția prolactinoamelor, lipsesc cu desăvârșire corelațiile dintre expresia HER2, EGFR și hormonii secretați în diferitele tipuri de adenoame hipofizare. Mai mult, datele referitoare la potențialul rol al HER2 și EGFR în dezvoltarea și progresia adenoamelor hipofizare sunt foarte vechi, fiind publicate în perioada 1994-2004.

Toate aceste aspecte au constituit motivația studiului EGFR și HER2 pe adenoamele hipofizare selectate.

Evaluare expresiei imunohistochemice și a amplificării genice a proteinei HER2 în adenoamele hipofizare. Specimenul de hipofiză normală a fost negativ la imunocolorarea cu anticorpi anti HER2. Mai mult de o treime din totalul cazurilor de adenoame hipofizare (33,33%) au prezentat reacție imunohistochimică pozitivă la HER 2. Reacția a avut un pattern membranar

și citoplasmatic (Figura 1 a, b), cu predominanța celui membranar. Restricționarea membranară a expresiei HER2 s-a remarcat la celulele bazofile din cadrul adenoamelor hipofizare cu celule bazofile sau din cadrul celor mixte. Pentru celulele acidofile din componența adenoamelor hipofizare expresia imunohistochimică a HER2 a fost predominant citoplasmatică, având un pattern granular (Figura 5.34, b).

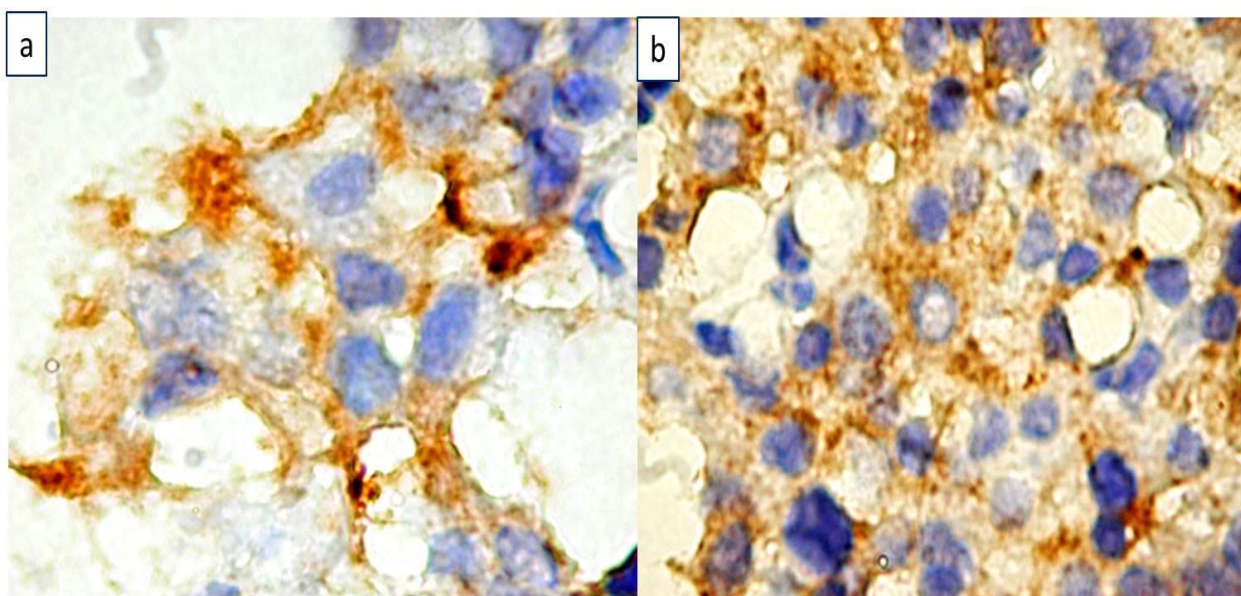


Fig.5.34. Expresia imunohistochimică a proteinei HER2 în adenoamele hipofizare, cu cele două pattern-uri de expresie: membranar (a) și granular citoplasmatic (b).

În majoritatea cazurilor reacția membranară a prezentat un pattern discontinuu, cu intensificări punctiforme de-a lungul circumferinței membranei celulare (Figura 5.35). Expresia citoplasmatică a fost omogenă, cu un pattern granular. Ca distribuție, celulele pozitive au avut o distribuție focală fiind organizate în grupuri mici sau plaje de celule tumorale pozitive pentru proteina HER2. Intensitatea reacției pozitive a fost în majoritatea cazurilor slabă și moderată.

După cuantificarea expresiei imunohistochimice a proteinei HER2, s-a urmărit dacă, pozitivarea sa se asociază cu diferitele tipuri histopatologice sau cu pattern-urile de creștere ale adenoamelor hipofizare.

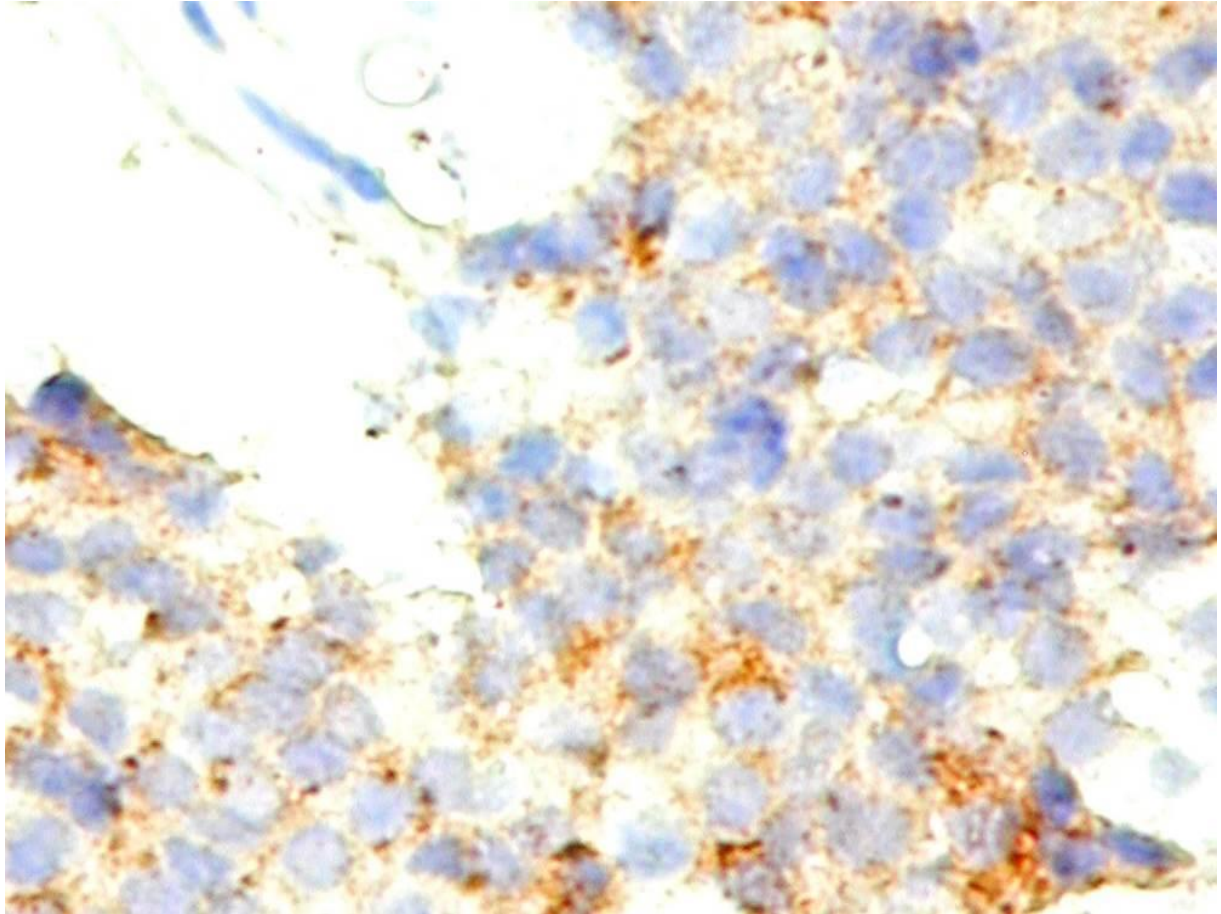


Fig. 5.35. Aspectul punctiform, discontinuu al expresiei membranare pentru HER2 în adenoamele hipofizare.

Din totalul cazurilor pozitive pentru HER2, un procent de 40% au fost adenoame hipofizare de tip mixt. Ariile cromofobe au fost prezente în toate adenoamele hipofizare de tip mixt fiind asociate cel mai frecvent cu arii de tip acidofil (în 62,5% din cazuri) și arii de tip bazofil (37,5% din cazuri). În majoritatea cazurilor, ariile de tip cromofob au avut o intensitate mai mare a expresiei proteinei HER2 comparativ cu ariile acidofile sau bazofile.

Ca pattern de creștere, cel papilar a fost frecvent întâlnit, fiind observat în 45% din cazurile pozitive la proteina HER2. Adenoamele papilare HER2 pozitive au fost heterogene din punct de vedere al tinctorialității celulare. Aproximativ jumătate dintre ele (55,5%) au fost adenoame de tip papilar cu celule bazofile (Figura 5.36), 33,3% adenoame papilare cu celule acidofile, restul (11,2%) fiind constituite din celule cromofobe [60].

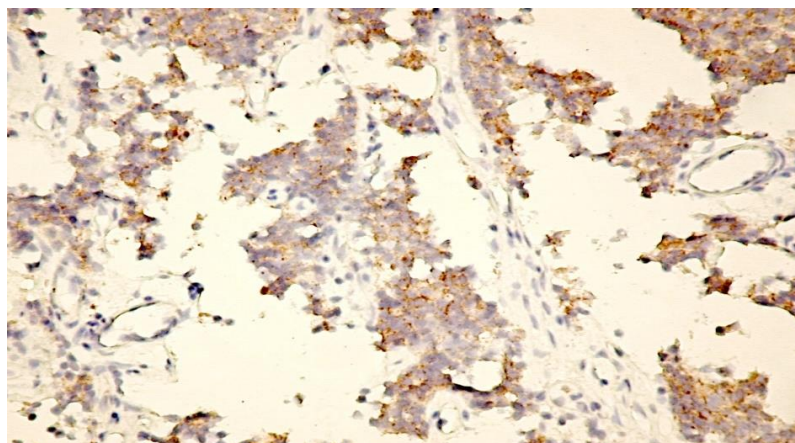


Fig. 5.36. HER 2, scor +2 în tipul papilar cu celule bazofile de adenom hipofizar.

Pattern-ul de creștere compact (solid) a fost prezent tot în 45% din cazurile HER2 pozitive. Distribuția pe tipuri de celule a fost următoarea: 33,3% au fost constituite din celule acidofile, 44,4% au fost de tip mixt cu celule cromofobe asociate celulelor acidofile sau bazofile iar 22,3% au fost constituite din celule bazofile. Comparativ, procentul de cazuri HER2 pozitive raportat la formele histopatologice de tip solid și papilar corelate cu tipurile citologice este redat în Figura 5.37.

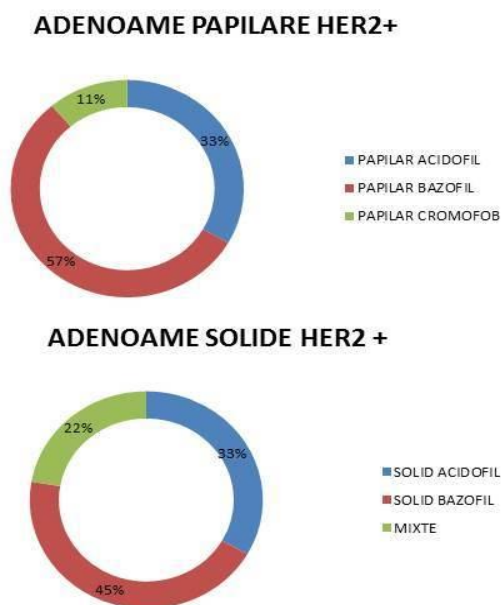


Fig. 5.37. Reprezentarea grafică, comparativă a tipurilor de adenoame hipofizare de tip papilar și solid în raport cu tipurile de celule acidofile, bazofile sau cromofobe. Se observă un număr de cazuri mai mare pentru forma papilară cu celule bazofile comparativ cu tipul solid bazofil. Numărul adenoamelor solide mixte ce au inclus și arii cromofobe a fost semnificativ mai mare pentru cazurile HER2 pozitive, comparativ cu tipul papilar cromofob.

Doar 10% de adenome hipofizare HER2 pozitive au prezentat un pattern trabecular cu celule bazofile (50%) și cromofobe 50% (Figura 5.38).

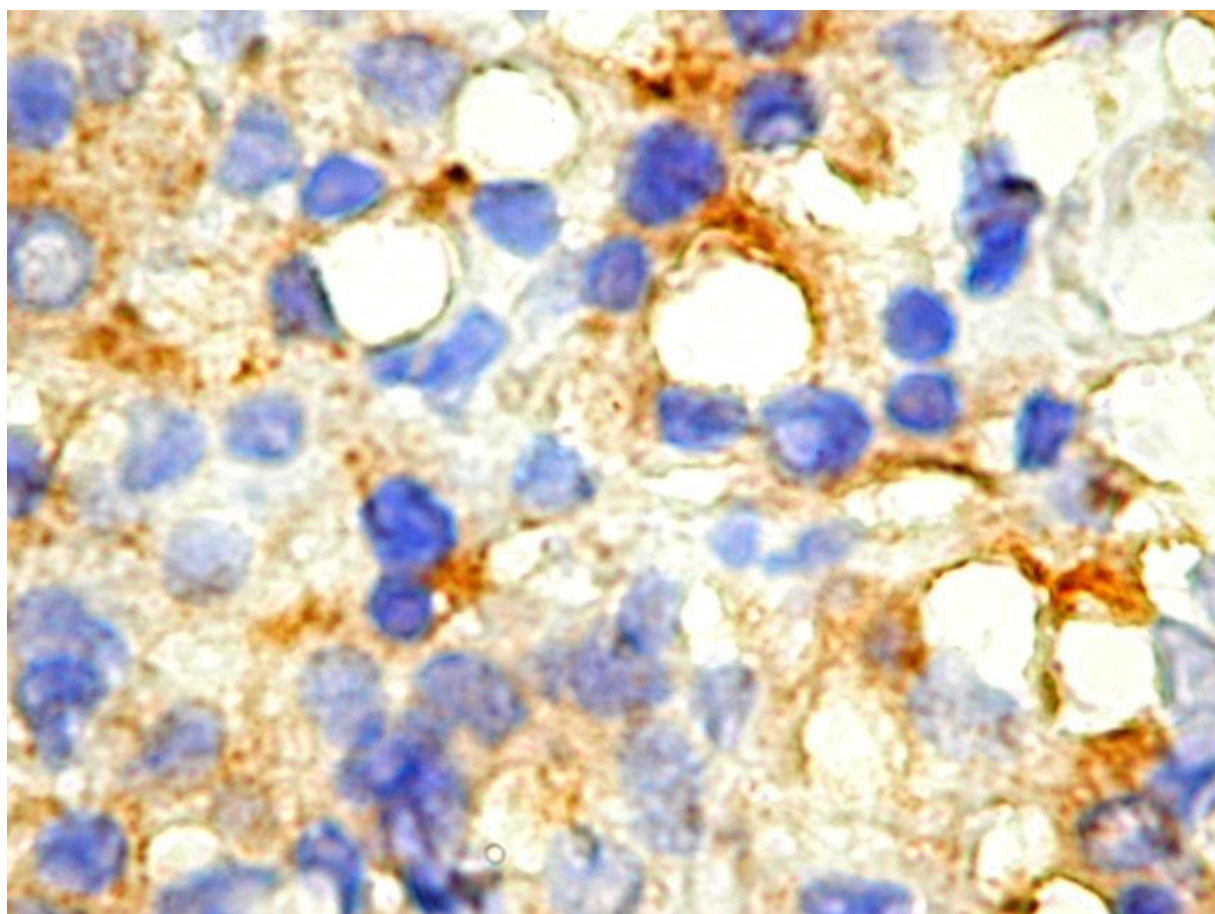


Fig. 5.38. Celule cromofobe pozitive la proteina HER2 cu expresie imunohistochimică intensă în cadrul unui adenom hipofizar de tip mixt.

Ulterior, expresia proteinei HER2 a fost corelată cu profilul imunohistochimic al hormonilor hipofizari, pe de o parte și cu expresia EGFR și a VEGF pe de altă parte. Nu s-a înregistrat corelație semnificativ statistică între expresia HER2 și adenomele hipofizare GH secretante ($p=0.162$). În schimb, profilul hormonal de tip PRL s-a corelat semnificativ statistic cu expresia imunohistochimică a HER2. Pentru celelalte tipuri de hormoni nu s-au înregistrat corelații semnificativ statistice cu HER2, valorile pentru fiecare dintre asocieri fiind redată după cum urmează: TSH-HER2 ($p=0.232$), ACTH-HER2 ($p=0.727$), FSH-HER2 (0.949) și LH-HER2 (0.364).

Studiul expresiei HER2 în adenomele hipofizare a continuat cu evaluarea corelației dintre hormonii hipofizari, pentru a vedea dacă, în cazul adenomelor hipofizare HER2 pozitive,

asocierile hormonale diferă față de cele obținute în cazul tuturor adenoamelor hipofizare. Astfel, în adenoamele hipofizare HER2 pozitive, s-a înregistrat co-expresia GH-PRL care a avut o valoare semnificativ statistică ($p=0.005$). De asemenea o corelație parțială de tip Kendall ($p=0.036$) și Spearman ($p=0.032$) s-a înregistrat pentru co-expresia PRL-LH.

Pentru TSH –FSH și TSH –LH în cazurile HER2 pozitive corelația de co-expresie a fost semnificativ statistică pentru ambii hormoni, având un $p=0.028$, și respectiv $p=0.024$. O altă co-expresie semnificativ statistică s-a înregistrat între FSH-LH ($p=0.000$) pentru adenoamele HER2 pozitive. Expresia HER2 nu s-a corelat cu expresia EGFR și nici cu cea a factorului de creștere al endoteliului vascular, ambele studiate în această temă [59].

Jumătatea din cazurile de adenoame hipofizare pozitive pentru HER2 (50%) au primit un scor de +2 la interpretarea microscopică a reacției imunohistochemice, 45% au fost catalogate ca având un scor de +1 și doar 5% au prezentat expresie intensă a HER2 notată cu +3. Din aceste motive, pentru a respecta protocolul de evaluare a HER2 aplicat în tumorile mamare, toate cazurile +2 pozitive au fost reevaluate pentru detectarea amplificării genice prin metoda de hibridizare in situ cu chromogen (CISH).

Amplificarea genică a confirmat expresia imunohistochemică a proteinei HER2 în 33,34% din cazurile pozitive imunohistochemic pentru proteina HER2. Zonele cu amplificare genică au coincis, în aceste cazuri cu zonele detectate ca fiind pozitive prin imunohistochemie, reacția de hibridizare in situ fiind restricționată la nivel nuclear, cu un pattern punctiform. Prezența genei HER 2 fără amplificare a fost detectată în celulele adenoamelor hipofizare prin prezența a două semnale pozitive de culoare brună distribuite în pereche și localizate strict intranuclear (Figura 5.39).

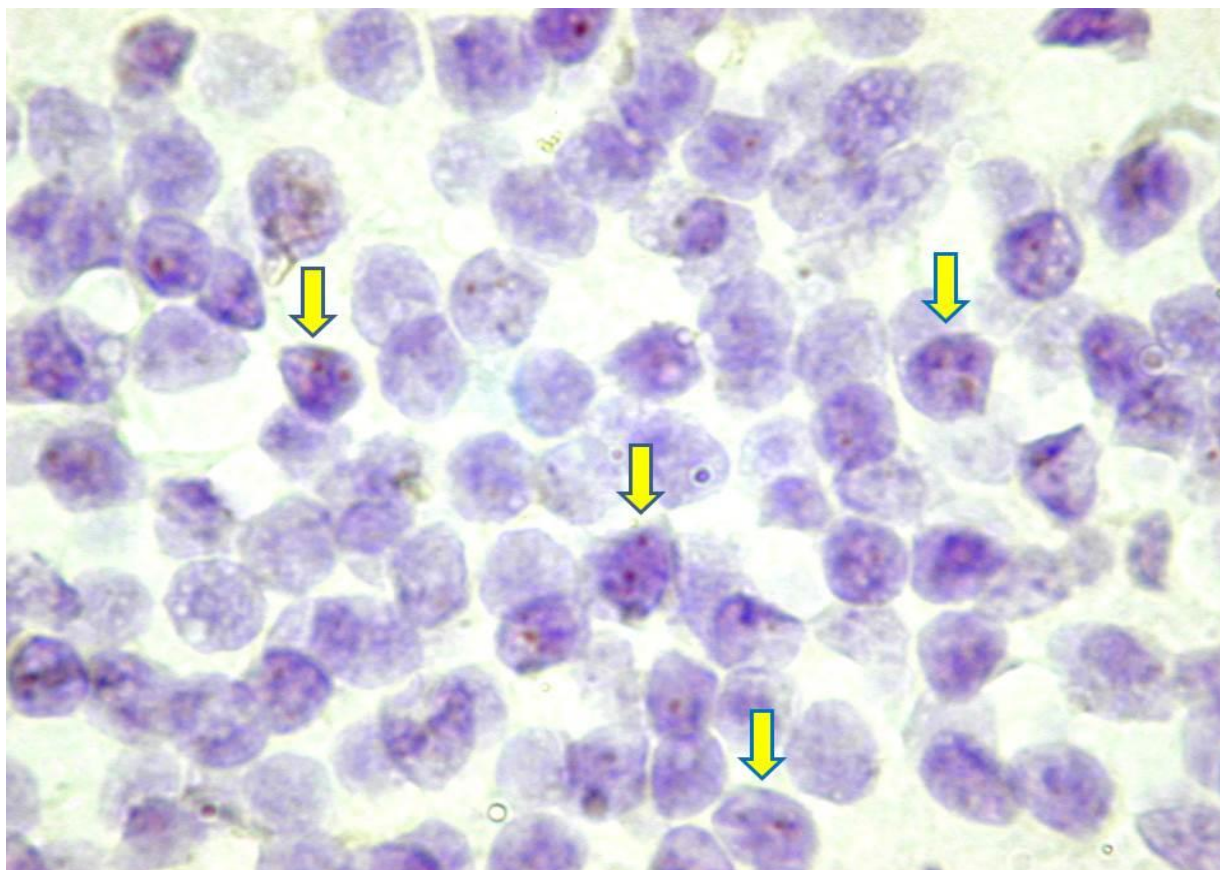


Fig. 5.39. Detectarea prin hibridizare in situ cu cromogen (CISH) a genei proteinei HER2. Prezența sa fără amplificare a fost detectată prin observarea a două semnale pozitive punctiforme de culoare brună, distribuite în pereche în interiorul nucleului celulelor tumorale din cadrul adenoamelor hipofizare. De notat prezența acestor tipuri celulare (săgeată) în adenoamele hipofizare HER2 pozitive, notate cu +1.

Cazurile cu amplificare genică au fost extrem de heterogene, pe deoparte în ceea ce privește numărul de celule tumorale care au prezentat amplificare genică și, pe de altă parte, de gradul amplificării genice, evidențiat prin prezența intranucleară a trei sau mai multe semnale punctiforme distincte sau asociate sub formă de clustere (blocuri) de dimensiuni mari, unice sau multiple considerate ca fiind expresia unei amplificări genice puternice.

Semnalele pozitive distincte, de culoare brună în număr mai mare de 3/nucleu, au reprezentat pattern-ul predominant al amplificării HER2 în adenoamele hipofizare notate cu +2 și +3 (Figura 5.40.a, b, c). Rar, s-a observat prezența clusterelor intranucleare de culoare brună care atestă o amplificare genică semnificativă (Figura 5.40d).

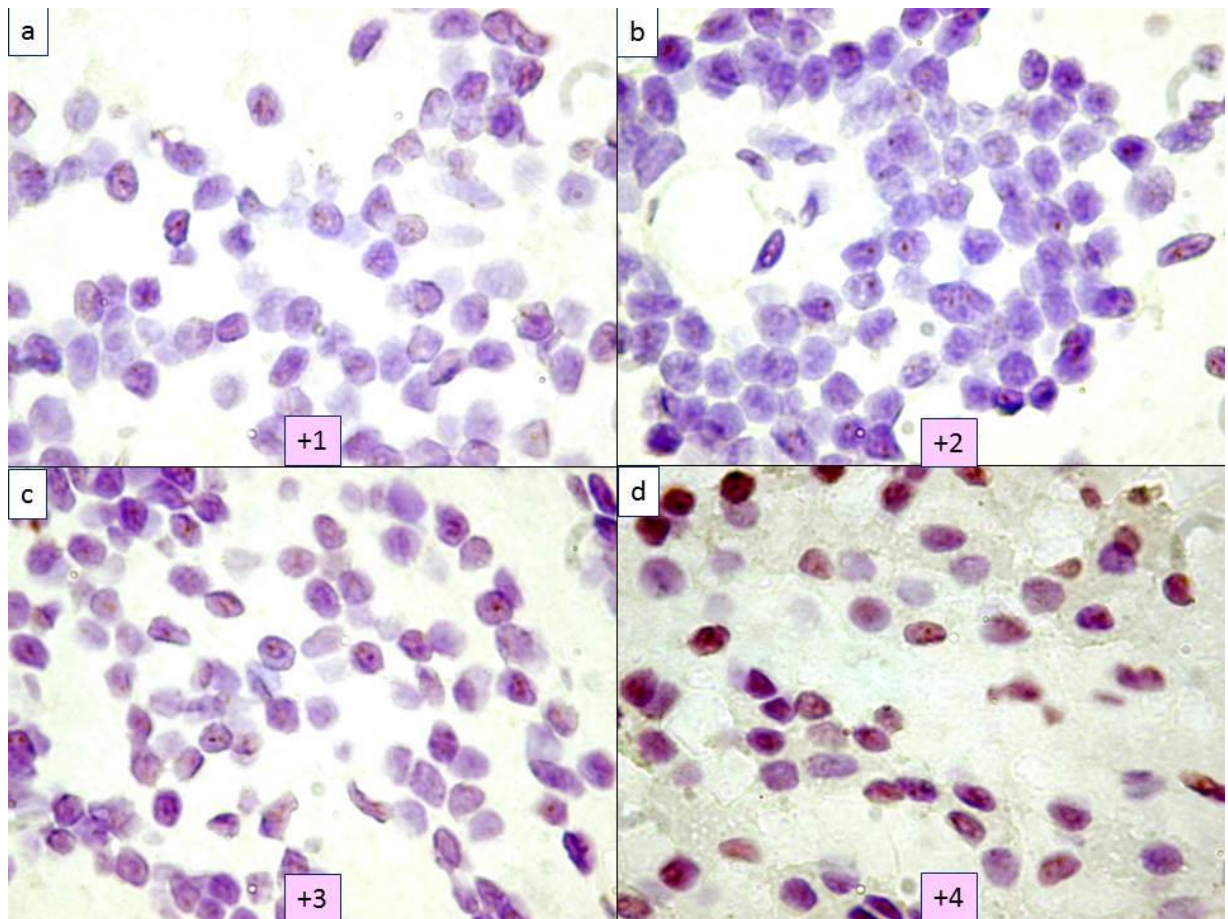


Fig. 5.40. Amplificarea genică obținută în adenoamele hipofizare, în grade variabile de expresie notate cu +1 -+4. Au fost considerate ca fiind concludente pentru certificarea expresiei imunohistochimice cazurile cu un scor de 3 și 4.

Implicațiile EGFR în patogeneza adenoamelor hipofizare. Posibil rol pentru o terapie țintită. Analiza expresiei EGFR în adenoamele hipofizare a relevat faptul că, un procent de 48.33% din cazuri au fost pozitive pentru acest marker. S-a înregistrat o heterogenitate de expresie a EGFR în adenoamele hipofizare studiate, raportată la pattern-ul de expresie precum și la intensitatea expresiei imunohistochimice. Au fost observate trei pattern-uri de expresie: clasic, restricționat la membrana celulară (M) cu un aspect continuu și intensitate omogenă (Figura 5.41), membranar (continuu sau discontinuu) și citoplasmatic (cu aspect granular) (MC) și doar citoplasmatic (C) cu aspect granular sau difuz.

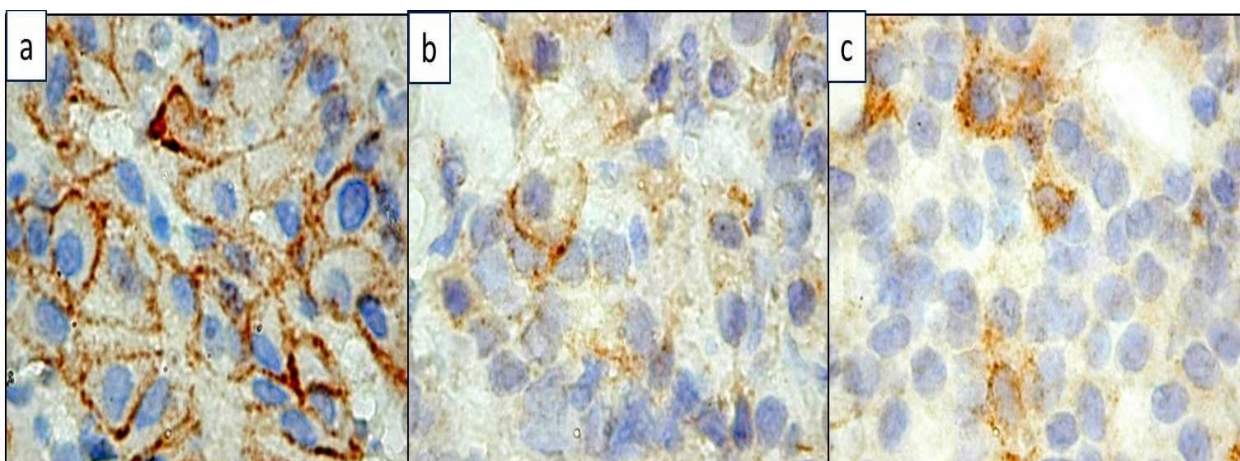


Fig. 5.41. Pattern-ul de expresie al EGFR în adenoamele hipofizare: membranar (a), membranar și citoplasmatic (b) și citoplasmatic (c).

Ca intensitate a predominat expresia moderată și intensă pentru majoritatea cazurilor. Raportat la scorul de expresie, care a cuantificat numărul de celule pozitive și intensitatea expresiei, 51,72% din cazuri au prezentat un scor de +2 și +3, restul fiind notate cu +1. Pattern-ul de creștere solid s-a remarcat în 45% din cazurile de adenoame hipofizare studiate, pozitive la EGFR, în timp ce pattern-ul papilar a fost observat în 35% din EGFR pozitive [59]. Restul au fost, în proporții variabile adenoame hipofizare de tip trabecular, alveolar, fusiform și cu pattern mixt de creștere, așa cum rezultă și din graficul reprezentat în Figura 5.42.

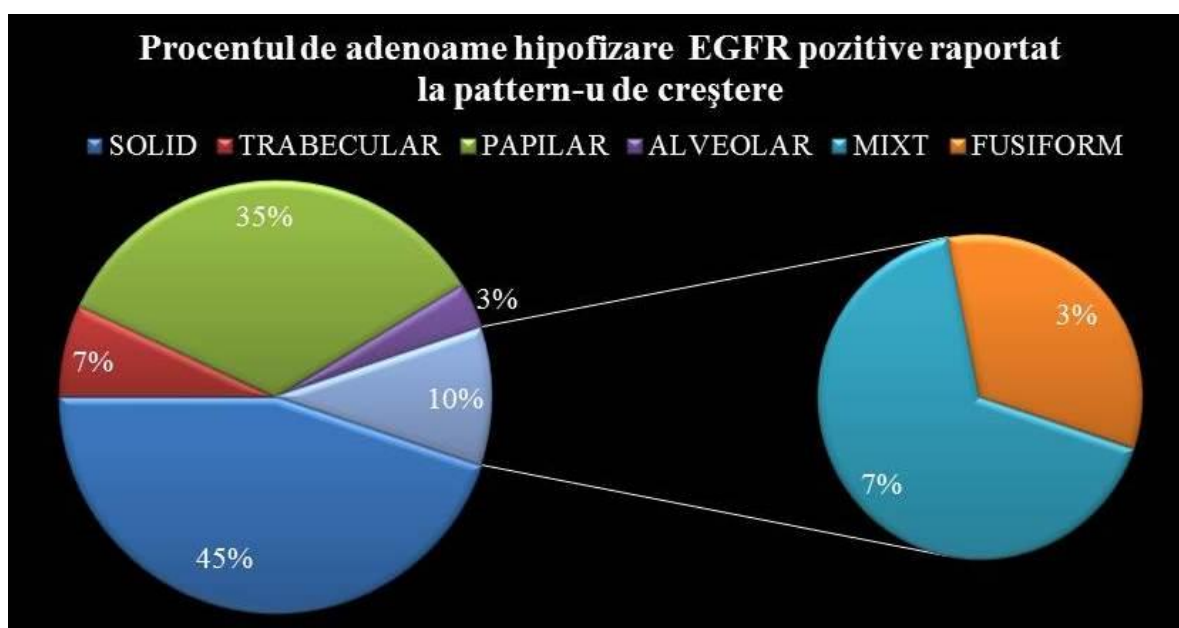


Fig. 5.42. Distribuția cazurilor EGFR pozitive dependent de pattern-ul de creștere.

Scorul de expresie al EGFR a variat între 1 și 3. Expresia microscopică a scorului utilizat poate fi observat în Figura 5.43. Se remarcă heterogenitatea numărului de celule pozitive, cât și diferențele de localizare a reacției pozitive.

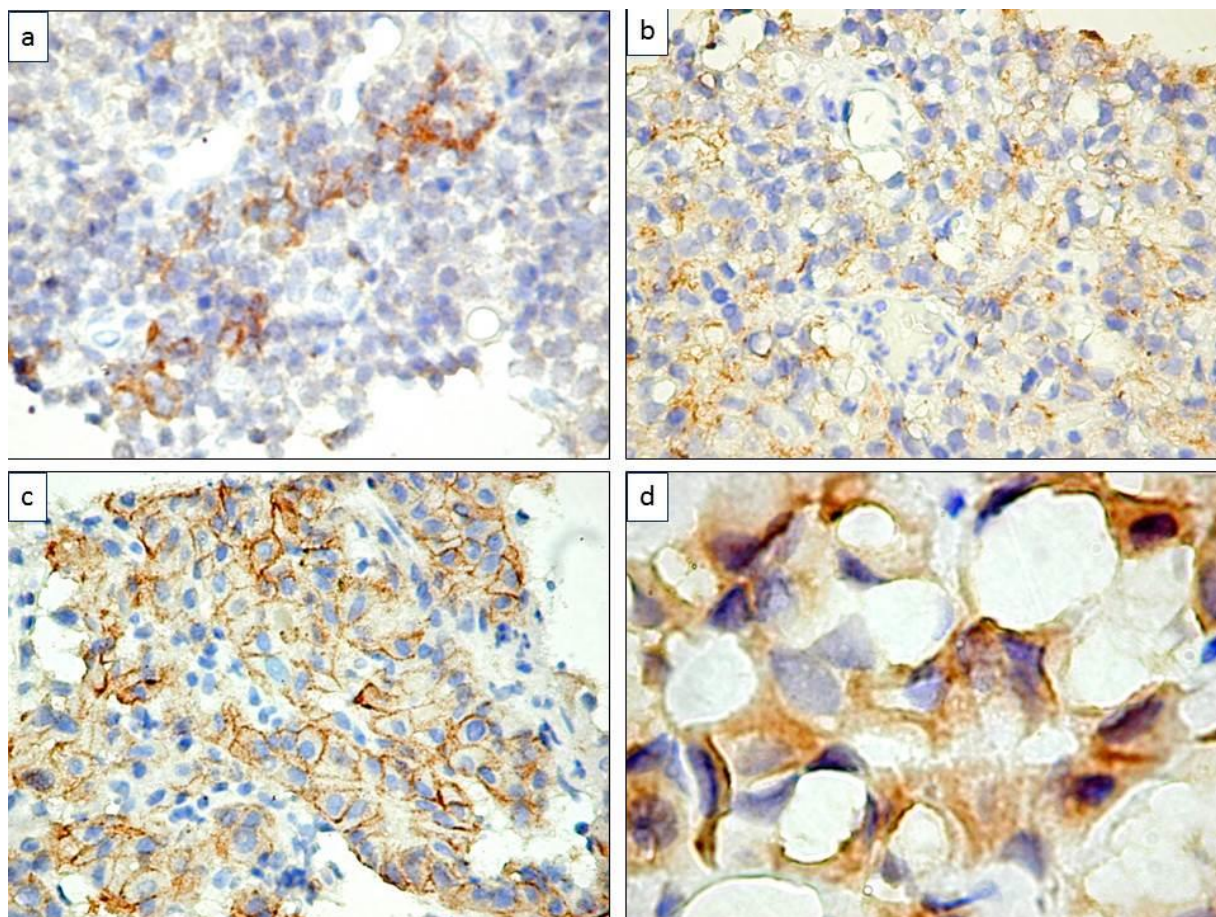


Fig. 5.43. Scorul de interpretare aplicat pentru EGFR în adenoamele hipofizare, pornind de la scor 1(a, membranar), și continuând cu scorul 2 (b, de asemenea membranar) și 3 (c, membranar și d, citoplasmatic).

Ca și în cazul proteinei HER2, pentru identificarea EGFR ca potențial factor de prognostic sau terapeutic, studiul a continuat cu identificarea corelațiilor dintre profilul hormonal cuantificat imunohistochimic și expresia EGFR. Spre deosebire de cuantificarea HER2 în care s-a demonstrat o corelație semnificativ statistică între expresia HER2 și secreția de PRL, pentru EGFR nu s-a demonstrat co-expresie pentru nici unul din hormonii hipofizari evaluați, cuantificați separat în raport cu expresia EGFR. Analiza statistică a datelor descrise mai sus și valoarea corelațiilor dintre hormonii hipofizari și expresia EGFR sunt sumarizate în Figura 5.44.

	EGFR	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GH	Between Groups	2.833	2	1.416	.710	.501
	Within Groups	51.857	26	1.995		
	Total	54.690	28			
PRL	Between Groups	.155	2	7.772E-02	.055	.946
	Within Groups	36.603	26	1.408		
	Total	36.759	28			
TSH	Between Groups	6.568E-02	2	3.284E-02	.046	.956
	Within Groups	18.762	26	.722		
	Total	18.828	28			
ACTH	Between Groups	4.635	2	2.317	2.392	.112
	Within Groups	24.222	25	.969		
	Total	28.857	27			
FSH	Between Groups	1.355	2	.677	.633	.539
	Within Groups	27.817	26	1.070		
	Total	29.172	28			
LH	Between Groups	9.544E-02	2	4.772E-02	.652	.530
	Within Groups	1.756	24	7.318E-02		
	Total	1.852	26			

Fig. 5.44. Analiza statistică a evaluării corelațiilor dintre profilul hormonal al adenoamelor hipofizare cuantificat imunohistochimic și expresia EGFR

Pentru a putea identifica cele mai frecvente asocieri hormonale în grupul cazurilor EGFR pozitive, au fost cuantificate co-expreșiile hormonilor hipofizari.

Pentru GH s-a demonstrat că cea mai frecventă co-expresie a fost cea cu PRL, fapt susținut și de corelația semnificativ statistică obținută pentru acest grup ($p=0.000$), nici un alt tip de hormon nu a mai fost co-exprimit într-o proporție semnificativă, atât corelația cu TSH ($p=0.105$), cât și cea cu ACTH ($p=0.632$) nefiind semnificative din punct de vedere statistic. În schimb, PRL a prezentat o corelație parțială cu secreția de TSH (Kendall=0.053, Spearman=0.047) și o corelație totală cu ACTH (Pearson=0.045, Kendall=0.008 și Spearman=0.009). Toate corelațiile parțiale sau totale, cu semnificație statistică sunt redate mai jos (Figura 5.45 pentru GH-PRL, și Figura 5.46 pentru PRL-TSH și PRL- ACTH).

		GH	PRL				GH	PRL
GH	Pearson Correlation	1.000	.638	Kendall's tau_b	GH	Correlation Coefficient	1.000	.650
	Sig. (1-tailed)	.	.000			Sig. (1-tailed)	.	.000
	N	29	29			N	29	29
PRL	Pearson Correlation	.638	1.000		PRL	Correlation Coefficient	.650	1.000
	Sig. (1-tailed)	.000	.			Sig. (1-tailed)	.000	.
	N	29	29			N	29	29
				Spearman's rho	GH	Correlation Coefficient	1.000	.717
						Sig. (1-tailed)	.	.000
						N	29	29
					PRL	Correlation Coefficient	.717	1.000
						Sig. (1-tailed)	.000	.
						N	29	29

Fig. 5.45. Datele statistice care atestă corelația completă între GH și PRL pentru cazurile de adenoame hipofizare EGFR pozitive

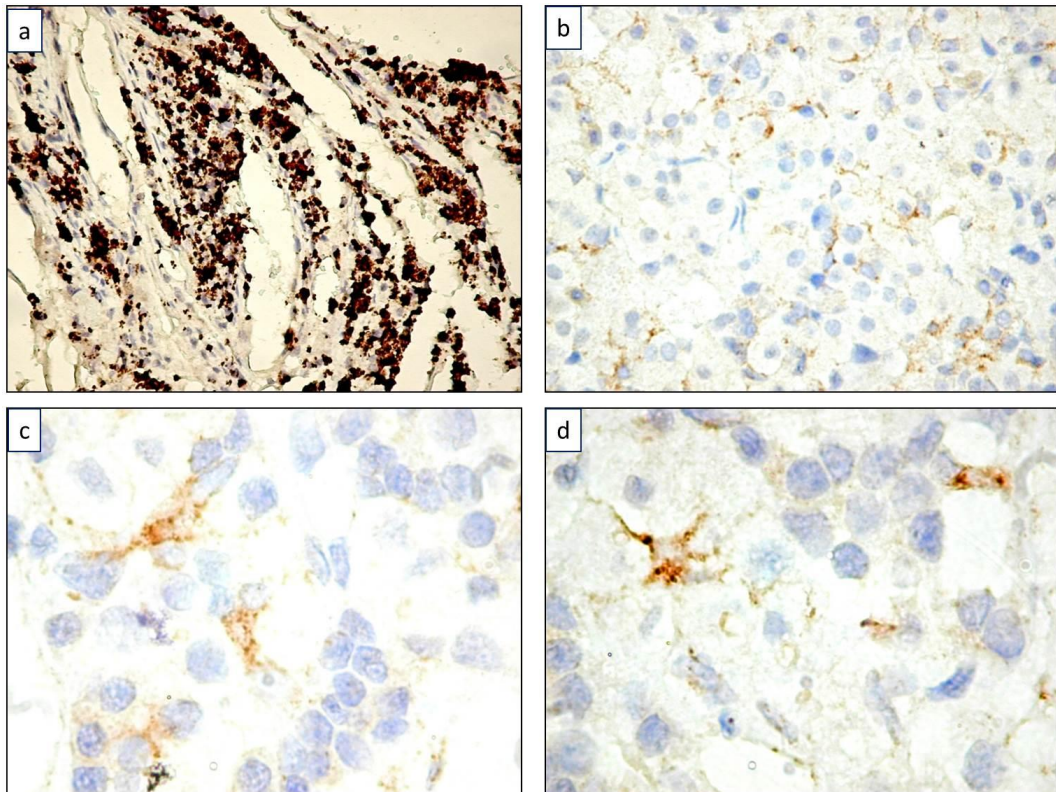


Fig. 5.47. Acumulare masivă de macrofage EGFR + la periferia tumorii (a). Distribuția globală a celulelor foliculo stelate (b), observate în detaliu pentru aspectul omogen (c) și granular (d) al EGFR.

Discuții. Proteinele HER1 și HER2 sunt recunoscute ca fiind ținte terapeutice importante în numeroase patologii maligne precum cancerul mamar [66, 136], cancerul pulmonar [62, 120] sau cel gastric [223, 251]. Pentru astfel de receptori tirozinkinazici au fost dezvoltate terapii țintite, cea mai cunoscută fiind Herceptina, aprobată și aplicată pe scară largă în cancerul mamar cu metastaze, [34] dar și terapii țintite anti EGFR [166].

Studiul celor doi receptori în adenoamele hipofizare este foarte puțin aplicat în prezent. În ultimii 10 ani au fost publicate mai puțin de 10 articole având ca temă implicarea oncoproteinei HER2/neu în adenoamele hipofizare, majoritatea dintre ele fiind de tip experimental (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=c+erbB2%2C+pituitary+adenomas>).

Cu excepția unui singur articol în care, expresia EGFR și a oncoproteinei HER2/neu este minuțios descrisă ca expresie în celulele lactotrofe și corticotrofe, [58] în prezent nu este certificat rolul prognostic al acestor factori în evoluția și progresia adenoamelor hipofizare. Contrar celor descrise în capitolul menționat anterior, nu am remarcat expresia proteinei

HER2/neu în țesutul hipofizar normal. În schimb, procentul de adenoame hipofizare care a fost pozitiv la oncoproteina HER2/neu a fost similar cu cel întâlnit în cazul cancerului mamar cu metastaze, respectiv, aproximativ o treime din cazurile analizate [243]. Adenoamele hipofizare au avut un pattern de expresie membranar și citoplasmatic diferențiat în funcție de tipul celulelor care au constituit adenoamele hipofizare. În celulele bazofile expresia oncoproteinei HER2/neu a fost restricționată membranar, similar cu cea întâlnită și cuantificată în celulele tumorale din neoplaziile mamare, [189] în timp ce în celulele acidofile expresia HER2/neu a fost predominant granular citoplasmatică, cu sau fără intensificare membranară, similară cu cea descrisă în majoritatea cancerelor gastrice pozitive pentru acest marker [139]. Expresia citoplasmatică a HER2/neu în cancerul gastric s-a corelat semnificativ statistic cu vârsta și expresia HER3, receptor bine cunoscut ca având o afinitate de heterodimerizare ridicată cu HER2 și, prin aceasta fiind un factor de prognostic nefavorabil în cancerul mamar prin determinarea rezistenței la terapia cu Trastuzumab [106]. În adenoamele hipofizare cu celule acidofile expresia citoplasmatică a fost predominantă, aspect care ar sugera o heterodimerizare accentuată a HER2 cu HER3 ce ar putea constitui un factor de prognostic nefavorabil și în adenoamele hipofizare cu celule acidofile. Spre deosebire de celelalte studii privind expresia proteinei HER2 în adenoamele hipofizare, prezentul studiu a remarcat supraexpresia sa în adenoamele hipofizare cu celule cromofobe, aspect care nu a mai fost menționat anterior. Independent de tipul solid sau papilar, HER2 a fost pozitiv în aproximativ 66% din cazurile cu celule acidofile. În adenoamele hipofizare pure, supraexpresia HER2 s-a corelat cu secreția de PRL dar nu și cu cea a GH. Această corelație susține și mai mult implicarea heterodimerizării HER2 cu HER3 în adenoamele hipofizare PRL secretante, aspect bazat și pe faptul că, există date publicate anterior care au demonstrat rolul prognostic nefavorabil al asocierii HER2/HER3 ca factor de agresivitate crescută în adenoamele hipofizare PRL secretante și au sugerat că inhibarea țintită a acestei supraexpresii ar putea fi o alternativă terapeutică utilă în cazul prolactinoamelor cu evoluție nefavorabilă, rezistente la terapia convențională [321]. În sprijinul acestei ipoteze pot fi considerate și datele publicate de Zhao și Ren care au demonstrat că secreția de Neuregulin (ligand pentru HER3) funcționează ca reglator al sintezei de PRL printr-un posibil mecanism paracrin/juxtacrin [349].

În schimb, pentru adenoamele hipofizare cu profil hormonal dublu, expresia concomitentă a GH-PRL s-a corelat semnificativ statistic cu expresia HER2. Aceste date sunt în concordanță cu cele publicate anterior [25], care au demonstrat că, mai mult de jumătate din cazurile de adenoame hipofizare GH-PRL au fost pozitive pentru oncoproteina HER2 și din

acestea jumătate au prezentat supraexpresia proteinei p53 suprapus parțial cu un indice crescut de proliferare.

Un aspect particular al studiului de față îl reprezintă asocierile hormonale de tip TSH-LH și TSH-FSH care s-au corelat semnificativ cu supraexpresia proteinei HER2. Această asociere nu a mai fost raportată în literatură și poate fi studiată ca factor de prognostic. O altă pereche de hormoni care s-au exprimat în tandem în cazurile de adenoame hipofizare HER2 pozitive a fost cea constituită din FSH și LH, co-expresia acestora având o corelație completă cu supraexpresia proteinei HER2 în adenoamele hipofizare. Această corelație a confirmat expresia HER2 crescută în celulele cromofobe din adenoamele hipofizare studiate.

Nivelele serice crescute de FSH și LH au fost incriminate ca și factori de prognostic nefavorabil asociat (sau ca posibili inductori) supraexpresiei HER2 la pacientele în menopauză care au dezvoltat un cancer mamar cu o rată de proliferare superioară celor negative pentru HER2 [348]. Aceste date pot fi considerate drept evidență indirectă a faptului că, asocierea FSH-LH cu supraexpresia HER2 este un factor de prognostic nefavorabil care caracterizează un subtip de adenoame hipofizare. Nu am remarcat în literatură date referitoare la corelația dintre proteina HER2 și expresia FSH/LH pentru adenoamele hipofizare. De asemenea, studiul nostru a relevat asocierile de expresie hormonală de tip TSH-FSH și TSH-LH corelate semnificativ statistic cu expresia proteinei Her2. Nici pentru aceste particularități de expresie a profilului hormonal și a Her 2 nu există până în prezent date în literatură.

Dacă pentru proteina HER2/neu datele din literatură sunt puține, probele directe sau indirecte susțin o posibilă implicare a acesteia în cadrul unui grup bine definit de adenoame hipofizare cu celule acidofile.

Factorul de creștere epidermal are drept receptori, pe lângă bine cunoscuta proteină HER2/neu și alți trei receptori, respectiv HER1, HER3 și HER4. HER1, cunoscut și sub denumirea de EGFR, reprezintă o țintă terapeutică intens studiată în tumorile maligne, fiind de altfel suportul dezvoltării unor terapii țintite de tipul Cetuximab aplicat deja în cancerul colorectal și pulmonar [50, 157].

Prima descriere a expresiei EGFR în adenoamele hipofizare a fost publicată de Cahiadaru și colaboratorii în anul 1994 [41]. Autorii au remarcat faptul că EGFR s-a exprimat în 5-10% din celulele hipofizei normale, în special în celulele gonadotrofe și tireotrofe [41]. În studiul nostru, expresia EGFR în hipofiza normală a fost slabă și inconstantă restricționată la celulele cromofobe, aspect care ar putea fi în concordanță cu datele deja publicate. Tot aceiași autori au observat că, adenoamele non funcționale au cea mai mare rată de expresie a EGFR.

Această observație corespunde parțial cu rezultatele noastre, deoarece nu am găsit nici o corelație semnificativ statistică între expresia separată a fiecărui hormon hipofizar și supraexpresia EGFR. Totuși, analiza co-expresiei hormonilor, corelată cu supraexpresia EGFR a demonstrat că, în cazurile EGFR pozitive, am avut o corelație semnificativ statistică de co-expresie a GH-PRL și corelații parțiale pentru co-expresii de genul PRL-TSH și totale pentru PRL-ACTH.

Prezența PRL în toate asocierile hormonale prezentate ca fiind corelate semnificativ statistic cu expresia EGFR a fost anticipată și este susținută de un articol publicat în 2008 care, demonstrează că, EGFR determină creșterea secreției de PRL în model experimental și, inhibarea EGFR induce controlul creșterii tumorale și inhibarea secreției de PRL ceea ce ar putea constitui o țintă terapeutică promițătoare în cazul prolactinoamelor rezistente la tratamentul dopaminergic sau în cazurile rare de prolactinoame cu transformare malignă [320].

Un alt aspect particular obținut în cadrul cercetării de față este reprezentat de asocierea PRL-ACTH-EGFR, care s-au corelat complet, semnificativ statistic. Fukuoka și colaboratorii au studiat efectele inhibitori ale Gefitinib asupra celulelor ACTH secretorii izolate din adenoamele hipofizare ACTH secretante cu origine umană și canină și au demonstrat că inhibarea EGFR determină scăderea dimensiunilor tumorii, a nivelului de corticosteroizi, a hipercortizolemiei precum și reducerea masei adipoase omentale [92]. Prin toate aceste rezultate, autorii consideră că terapia cu Gefitinib ar putea fi o alternativă binevenită ce ar putea reduce intervențiile chirurgicale practicate pentru aceste tipuri de tumori hipofizare, bineînțeles cu o creștere a confortului pacientului. Alte studii asupra expresiei EGFR în adenoamele hipofizare susțin datele obținute de noi. Astfel, Kontogeorgous și colaboratorii au demonstrat supraexpresia EGFR în peste 60 % din adenoamele hipofizare corticotrofe și în doar 20% din adenoamele hipofizare somatotrofe și lactotrofe [160]. Aceste rezultate susțin corelația semnificativ statistică obținută pentru asocierea GH-PRL și a PRL-ACTH cu EGFR din studiul nostru. Scăderea proteinei p27/Kip1 în cazurile de adenoame hipofizare ACTH secretante corelat cu inhibarea de către expresia EGFR a aceluiași tip de proteină, sugerează că EGFR este implicat în tumorigeneza adenoamelor hipofizare ACTH secretante printr-un mecanism de inhibare a p27/Kip1[300].

Același Kontogeorgos a menționat pentru prima dată expresia EGFR în celulele folicular stelate din hipofiza normală. În studiul nostru am remarcat o densitate crescută de celule folicular stelate EGFR pozitive, distribuite printre celulele tumorale negative la EGFR din adenoamele hipofizare studiate. Rolul celulelor folicular stelate EGFR + nu a fost studiat până în prezent în adenoamele hipofizare.

5.4. Concluzii la capitolul 5

1. Heterogenitatea expresiei factorilor de creștere și a receptorilor corespondenți este dependentă de profilul hormonal al adenoamelor hipofizare.
2. Adenoamele hipofizare GH și PRL secretante sunt cele mai active din punct de vedere al sintezei și eliberării factorilor de creștere.
3. VEGF este cel mai intens exprimat din punct de vedere proteic și genic și reprezintă candidatul cu cele mai mari șanse de succes în ceea ce privește aplicarea terapiei țintite. Datorită expresiei sale în celulele tumorale și celulele folicular stelate, aplicarea terapiei anti VEGF ar putea avea o țintă dublă.
4. 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 potențarea reciprocă a sintezei și acțiunii autocrine sau paracrine.
5. PDGF A și B au avut o expresie particulară fiind localizați în nucleu și citoplasmă. Expresia nucleară a PDGF, mai ales în cazul PDGF beta sugerează implicarea oncogenei c-sis (v-sis) în patogeneza adenoamelor hipofizare, aspect încă nestudiat până în prezent.
6. VEGF 165b a fost pentru prima oară studiat în cadrul acestei teze de abilitare. Se pare că are un rol în inhibarea angiogenezei în adenoamele hipofizare cu celulele acidofile GH secretante unde am înregistrat o supraexpresie a sa.
7. EG VEGF se exprimă în celulele acidofile și cromofobe și este absent în celulele bazofile. Celulele bazofile din adenoamele hipofizare exprimă însă EG VEGF cu intensitate variabilă și distribuție heterogenă.
8. EG VEGF este implicat în patogeneza adenoamelor hipofizare, diferențiat, dependent de heterogenitatea celulară și a pattern-ului de creștere și influențează rata de proliferare a celulelor tumorale din adenoamele hipofizare.
9. Acțiunea proliferativă a EG VEGF este mult influențată de expresia PRL în anumite tipuri de adenoame hipofizare. Cu excepția PRL și LH, nici un alt hormon hipofizar nu influențează supraexpresia EG VEGF în adenoamele hipofizare
10. Combinația EG VEGF și EGFR, susținută de corelația semnificativ statistică obținută, caracterizează adenoamele hipofizare de tip compact acidofil secretante de GH și PRL
11. EG VEGF este implicat în realizarea pattern-ului papilar al adenoamelor hipofizare
12. Corelația EG VEGF cu PDGF A și PDGF B este specifică adenoamelor hipofizare cu

pattern de creștere papilar și celule tumorale bazofile, acest aspect, întâlnit și în alte tipuri papilare de carcinoame ale altor glande endocrine fiind considerat un factor favorizant al invaziei locale, metastazării și implicit a unui prognostic nefavorabil

13. Rolul celulelor foliculostelate în patogeneza adenoamelor hipofizare este incompletă caracterizată. Rezultatele noastre, obținute prin corelarea expresiei EG VEGF cu proteina S100 și a GFAP sugerează o reactivitate a celulelor foliculare stelate în patogeneza adenoamelor hipofizare. Momentan este greu de spus dacă această corelație se datorează activării celulelor foliculare stelate sau expresiei proteinei S100 și a GFAP și în celulele tumorale.
14. Prezentul studiu a evaluat pentru prima dată în mod diferențiat expresia EG VEGF în adenoamele hipofizare și a realizat corelații cu alți factori de creștere precum VEGF, EGFR sau PDGF A și B, factori deja certificați ca având un rol major în invazia și metastazarea tumorală.
15. Datele obținute sugerează existența în cadrul aceluiași forme histopatologice a unor forme moleculare distincte de adenoame hipofizare care, cel mai probabil, au un comportament diferit și un prognostic variabil, dependent de profilul molecular care-l caracterizează.
16. Prin analogie cu expresia citoplasmatică din carcinoamele gastrice, HER2 pare să fie un factor de prognostic nefavorabil pentru adenoamele hipofizare în care aceasta se exprimă citoplasmatic, cel mai probabil prin heterodimerizare cu HER3 mai ales pentru prolactinoamele cu evoluție agresivă și recidivantă.
17. Asocierile hormonale rare de tip TSH-FSH, TSH-LH dar și asocierile hormonale FSH-LH au fost întâlnite în cazurile HER2 pozitive, aspect ce poate fi considerat ca factor predictiv pentru evoluția nefavorabilă a acestor tipuri de adenoame hipofizare.
18. Prin analogie cu datele raportate în literatură privind implicarea prognostică nefavorabilă a nivelurilor serice crescute de FSH și LH ca posibili inductori ai supraexpresiei HER2 în cancerul mamar în postmenopauză, putem concluziona, și pe baza rezultatelor studiului nostru că, asocierea hormonală FSH-LH determină inducția supraexpresiei proteinei HER2 în adenoamele hipofizare și astfel caracterizează un subtip special de adenoame hipofizare
19. Rezultatele noastre sugerează utilizarea supraexpresiei HER2 ca posibilă țintă terapeutică în adenoamele hipofizare doar după realizarea unui protocol complet imunohistochimic și ISH care să evalueze cazurile selectate de adenoame hipofizare

20. La fel ca și HER2, supraexpresia EGFR s-a corelat semnificativ statistic cu asocierea hormonală GH-PRL, ceea ce dovedește că atât HER2 cât și EGFR caracterizează adenoamele hipofizare GH-PRL secretante și definesc o subclasă distinctă de adenoame hipofizare
21. Spre deosebire de HER2, EGFR a caracterizat un subgrup aparte de adenoame hipofizare PRL-ACTH secretante aceste rezultate confirmând încă o dată datele experimentale puține dar convingătoare din literatură referitoare la implicarea EGFR în tumorigeneza adenoamelor hipofizare ACTH secretante
22. Celulele foliculostelate au fost intens pozitive pentru EGFR, acestea fiind foarte bine observate în număr relativ crescut în adenoamele hipofizare non secretante. Rolul celulelor foliculostelate nu este pe deplin cunoscut în adenoamele hipofizare și, cu atât mai puțin implicarea EGFR secretat de acestea în patogeneza adenoamelor hipofizare non secretante.

6. DATE EPIDEMIOLOGICE ALE PROFILULUI HORMONAL AL ADENOAMELOR HIPOFIZARE DIN REPUBLICA MOLDOVA STUDIATE COMPARATIV CU PROFILUL ADENOAMELOR HIPOFIZARE DIN ROMANIA

Adenoamele pituitare sunt de obicei benigne și indolente. În timp ce unele din ele produc hipersecreție hormonală, hipopituitarism și disfuncție neurologică, altele nu produc simptome rămânând nedetectate. Într-adevăr, datele de autopsie și radiografie indică faptul că aceste tumori sunt de fapt relativ frecvente, cu rate generale de prevalență variind de la 10 la 22% (deși astfel de studii sunt cu siguranță supuse unor factori selectivi) [12, 49]. Gama largă a ratelor de incidență în cadrul studiilor individuale sugerează că există numeroși factori de risc responsabili de dezvoltarea acestora, sau că tumorile sunt operabile la diferite etape de monitoring. Creșterea tumorilor pare să fie promovată de către hormoni care modulează activitatea pituitară normală și prin factori de creștere care au fost implicați în cadrul dezvoltării fetale normale. Cel puțin o treime din tumorile hipofizare pot provoca o stare de sănătate complicată prin tulburări de dispoziție, disfuncție sexuală, infertilitate, obezitate, tulburări vizuale, hipertensiune, diabet zaharat și altele. Este bine stabilit faptul că adenoamele hipofizare apar din expansiunea clonală a celulelor somatice mutante, dar mecanismul cauzal implicat în tumorigeneză rămâne a fi stabilit. Unele gene specifice par să predisună la formarea tumorii hipofizare, în timp ce oncogenele nu joacă un rol în formarea tumorilor hipofizare. Am folosit o resursă cuprinzătoare, bazată pe populație, pentru a examina diferențele demografice ale ratelor de incidență pentru adenoamele hipofizare. Din câte cunoaștem, aceasta este prima dată când baza de date a fost utilizată pentru a examina demografia adenoamelor hipofizare în Republica Moldova și România.

Ținând cont de dimensiunile mici ale tumorilor hipofizare și a propensității acestora să existe asimptomatic sau să se manifeste prin simptome non –specifice insidioase a devenit o provocare măsurarea cu precizie și prevalența adenoamele pituitare în populația generală. Analiza histologică a specimenelor de autopsie și radiologie (tomografie computerizată (CT) și imagistica prin rezonanță magnetică (RMN)) de la pacienții aflați în tratament sau au fost studiate pentru afecțiuni legate și nelegate de boala hipofizară sunt sursele principale care au fost utilizate pentru estimarea prevalenței populației ce suferă de adenoame hipofizare.

Scopul principal al acestui studiu a fost de a estima rata de incidență și prevalența adenoamelor hipofizare relevante din punct de vedere clinic la o populație bine definită, care locuiesc în zona urbană și suburbană a RM și României. Am definit adenoamele hipofizare relevante clinic ca fiind cele asociate disfuncției endocrine și / sau efectului de masă.

Motivație. Adenoamele hipofizare reprezintă una din cele mai frecvente tumori intracraniene [143] fiind cea mai frecventă tumoare de la nivelul regiunii selare. Uneori comportamentul clinic neobișnuit la diferite vârste [310, 340] și heterogenitatea profilului hormonal stabilit imunohistochimic [286] fac dificilă stabilirea unui diagnostic corect și alegerea unei terapii optime. Heterogenitatea adenoamelor hipofizare a fost de asemenea raportată și la nivel genetic [173]. Mutațiile genetice din adenoamele hipofizare sau dovedit a fi asociate cu o incidență crescută a altor tipuri tumorale cum ar fi tumorile intracraniene [94] sindromul Carney [61, 234] sau Tipul 1 al neoplaziei endocrine multiple [95]. Mutațiile germinale în gena proteinei active cu receptorul aril hidrocarburic (AIP) au fost recent raportate ca reprezentând o proporție substanțială de adenom pituitar care secretă hormon de creștere. S-au efectuat puține studii asupra altor factori de risc potențiali, iar studiile raportate au fost în general mici și s-au concentrat în mare parte pe utilizarea contraceptivelor orale sau a preparatelor estrogenice, riscuri familiale sau în asociere cu alte neoplasme. Câțiva alți factori, deși nu au fost investigați anterior în legătură cu tumorile hipofizare, cum ar fi antecedentele bolii alergice și epilepsia, prezintă un interes potențial deoarece au fost implicați anterior în etiologia altor tipuri de tumori intracraniene.

Rezultatele clinice, imunohistochimice sau genetice discutabile găsite în literatură nu sunt singurele controversate privind tumorile pituitare. Datele epidemiologice privind adenoamele hipofizare ar putea ajuta la o alocare mai bună a resurselor umane pentru îngrijirea unor astfel de pacienți și de asemenea ar crește acuratețea diagnosticului pentru unele regiuni geografice în care identificarea unor astfel de afecțiuni este neglijată. Datele epidemiologice se referă la prevalența tumorilor pituitare și sunt de obicei raportate în țările dezvoltate. Prevalența tumorilor pituitare variază între 19 și 28 cazuri per 100000 în UK, până la 94 de cazuri per 100000 în Belgia și are o incidență cuprinsă între 0,4 și 8,2 per 100000 pe an [64, 65, 215]. Articolele publicate recent, privind epidemiologia descriptivă a adenoamelor hipofizare din USA au stratificat incidența tumorilor hipofizare în funcție de vârstă, sex, rasă sau subregiunile de unde au provenit pacienții. Diferențe semnificative au fost raportate privind incidența adenoamelor hipofizare între diferite grupuri rasiale în USA [100]. Datele epidemiologice despre adenoamele hipofizare din Europa sunt foarte rare, chiar pentru țările cu un sistem de sănătate foarte bine dezvoltat ca Austria și Elveția, unde registrele naționale de tumori cerebrale (care includ și adenoamele hipofizare) sunt relativ noi [88, 331]. Pentru țările mici, în special cele din Europa centrală și de est, astfel de date statistice sunt destul de recente, cum ar fi pentru România [10] sau total absente cum este cazul cu RM. Datele statistice și epidemiologice privind diferențele profilului hormonal între grupurile

populaționale sunt de asemenea reduse fiind raportate în special pentru prolactinoame, [45, 253, 302] celelalte tipuri de adenoame hipofizare fiind puțin studiate. Studiile menționate mai sus au acoperit o arie geografică foarte bine delimitată care a inclus o țară sau o regiune a unei țări. Nu există în acest moment un studiu comparativ al profilului hormonal din adenoamele hipofizare între grupele de pacienți între Moldova și România. Din acest motiv prezentul studiu este axat pe identificarea similitudinilor și diferențelor epidemiologice specifice bazate pe profilul hormonal al adenoamelor hipofizare provenite din România și RM.

6.1. Variabilitatea comparativă a paternurilor de creștere și a profilului hormonal a adenoamelor hipofizare pe teritoriul Republicii Moldova și România

Studiul actual examinează diferențele demografice ale profilului hormonal al adenoamelor hipofizare utilizând datele colectate pe teritoriul Republicii Moldova și al României, colectând o gamă largă de factori privind variabilele demografice, diagnostice și clinice și au început monitorizarea tumorilor cerebrale benigne. Această resursă ar putea oferi o oportunitate excelentă de a studia diferențele demografice în incidența adenomului pituitar benign. Prevalența înaltă a tumorilor hipofizare silențioase, așa numitelor „incidentalome” este susținută și de studiile imagistice IRM. Asemenea, modificări subtile aparente IRM sugestive pentru microadenoame hipofizare silențioase clinic sunt observate la aproximativ 10% din IRM efectuate de rutină. Cele mai multe publicații arată o frecvență mai înaltă a tumorilor hipofizare în rândul populației de sex feminin, această opinie nefiind confirmată în incidentalome descoperite post-mortem, în urma autopsiilor efectuate, care evidențiază o repartiție egală a celor două sexe. Deși adenoamele hipofizare survin în toate decadele de viață, apogeul incidenței se observă între a treia și a șasea decade ale vieții. Adenoamele pituitare funcționale fiind mai frecvente la persoane tinere, în comparație cu cele nefuncționale, care are o pondere crescută la populația vârstnică.

Evaluarea globală a acelor două grupuri a demonstrat prezența necorespondenței privind profilul hormonal al adenoamelor hipofizare din România și Republica Moldova (Figura 6.1a,b).

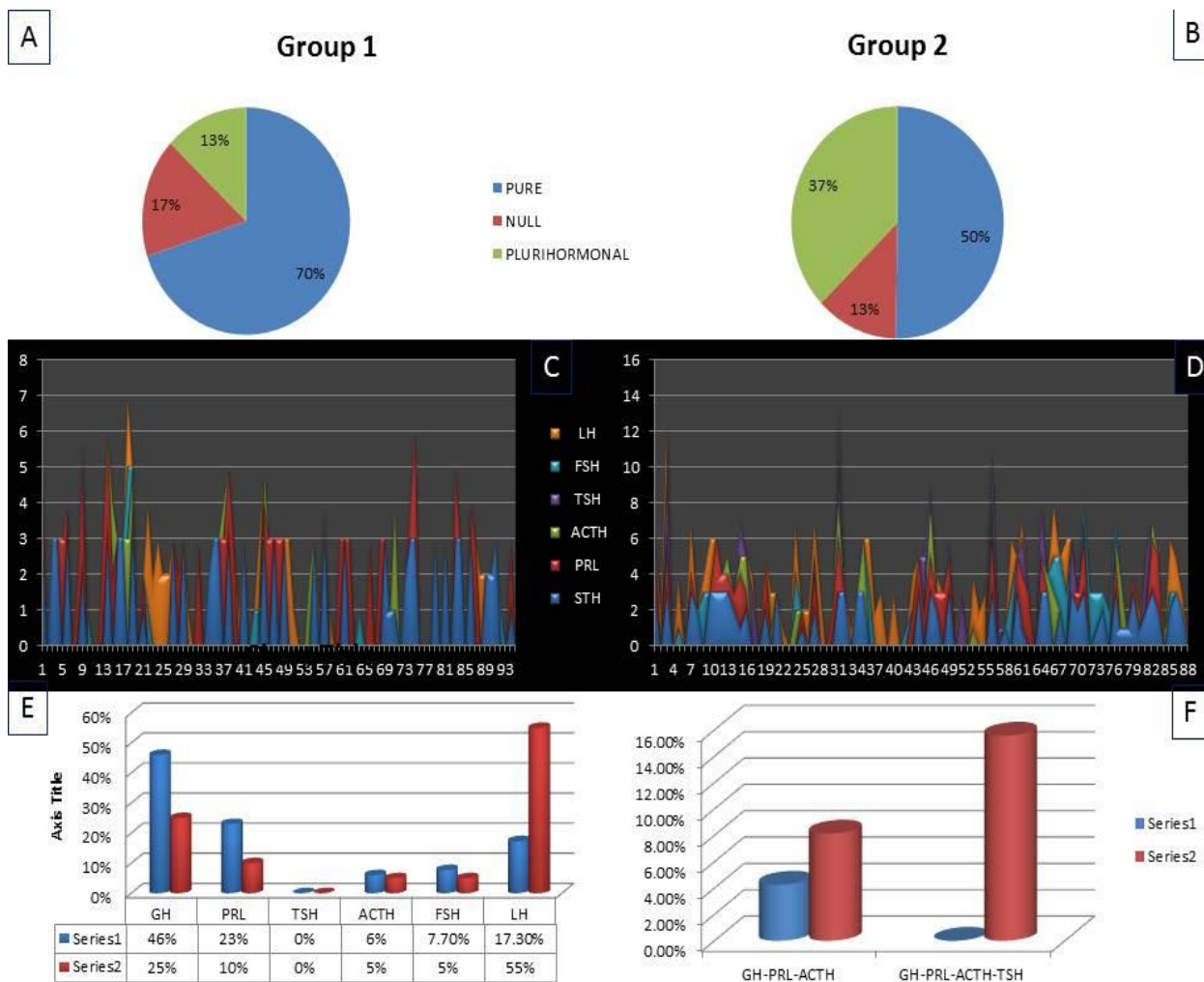


Fig. 6.1. Variabilitatea geografică a adenoamelor hipofizare Pentru grupurile B(România) și C (Republica Moldova)

Pentru grupul „B” 70% din cazuri au fost adenoame hipofizare pure, 13% plurihormonale, în timp ce 17% au fost negative pentru toate cele șase tipuri de hormoni. Comparativ cu grupul „B” în grupul „C” sau înregistrat mai multe diferențe privind distribuția procentuală a cazurilor pe grupele uniormonale, plurihormonale și nule. Cazurile de adenoame hipofizare pure au reprezentat 55,3% din numărul total de cazuri, iar cele nule 12,5%. Cea mai mare diferență între cele două grupuri s-a înregistrat pentru adenoamele hipofizare plurihormonale, în grupul „C” aceasta fiind de 37,2% (respectiv de 2,86 de ori mai mare în grupul „C” comparativ cu grupul „B”). Evaluarea specifică bazată pe fiecare tip de hormoni a demonstrat o incidență crescută a adenoamelor hipofizare GH secretante în grupul „B”, comparativ cu grupul „C”. Din cele 94 cazuri ale grupului „B” 46,15% au fost adenoame GH secretante comparativ cu grupul „C” unde am obținut doar 25% adenoame GH secretante. Pentru

prolactină (PRL) procentul de adenoame hipofizare pozitive a fost de 23% în grupul „B” și 10% pentru grupul „C”. Nici în unul din cele două grupuri incluse în studiu nu am întâlnit adenoame hipofizare pure secretante de TSH. În ceea ce privește adenoamele hipofizare ACTH secretante procentul de cazuri pozitive a fost relativ egal între cele două grupuri (6% pentru grupul „B” comparativ cu 5% pentru grupul „C”). Cea mai mare concordanță privind tipul hormonal al adenoamelor hipofizare în cele două grupuri s-a înregistrat pentru FSH care a avut o valoare similară pentru cele două grupuri (7,7% pentru grupul „B” versus 5% pentru grupul „C”). În contrast cu cele de mai sus cea mai mare diferență între procentele de cazuri pozitive la un singur hormon s-a înregistrat pentru LH. Dacă pentru grupul „B” procentul de cazuri LH pozitive a fost de 17%, pentru grupul „C” acest procent a fost de 3,25 ori mai mare, respectiv o valoare procentuală de 55% din numărul total de cazuri.

Adenoamele plurihormonale au fost împărțite în două subgrupe, care au fost evaluate separat. Cea mai frecventă asociere cunoscută între GH și PRL a fost prezentă în 10,36% din cazurile grupului „B” și în 13,63% din cazurile grupului „C”. Triplele asocieri au fost prezente în ambele grupuri dar cu diferențe privind numărul și tipul hormonal. Dacă grupul „B” a prezentat tripla asociere în 4,25% din cazuri, pentru grupul „C” această asociere a fost întâlnită în 8,13% din numărul total de cazuri. Pentru ambele grupuri asocierea GH, PRL, ACTH a fost predominantă. O particularitate a grupului „C” comparativ cu grupul „B” a reprezentat-o existența asocierilor particulare hormonale întâlnite foarte rar în literatură. Chiar dacă au fost prezente într-un număr mic de cazuri (15,56%), acestea au inclus patru tipuri hormonale: GH, PRL, TSH, ACTH. Comparativ cu tripla asociere al patrulea hormon alăturat a fost TSH prezent în toate cazurile de cvadruplă asociere.

Discuții. Date despre heterogenitatea geografică a tumorilor hipofizare au fost publicate anterior în relație cu variabilitatea genetică observate în special pentru adenoamele hipofizare familiale [12]. Studii populaționale privind epidemiologia adenoamelor hipofizare sunt puțin prezente în literatură, acest număr mic fiind datorat dificultăților de derulare a unor astfel de studii, care necesită o selecție foarte atentă a pacienților și o mare acuratețe a criteriilor de includere. Cele mai extinse studii privind diferențele regionale ale adenoamelor hipofizare au fost derulate de Clayton care a observat o prevalență a cazurilor cuprinse între 190-280 cazuri/milion, dintre care 32-36% au fost prolactinoame, 32-37 % au - tumori non-secretante, 21.1-21.4% au fost tumori GH secretante și 10.5-10.7% au avut boala Cushing [39, 53, 55]. Studiul nostru a evidențiat diferențe între grupurile „B” și „C” privind tipurile de adenoame hipofizare iar valorile obținute în au fost diferite comparativ cu cele raportate de Clayton. Într-un

alt studiu realizat în Provincia Liege, Belgia, [64] adenoamele GH secretante au fost prezente în 13,2% din cazuri, aceasta deținând cea mai mică valoare prezentă în literatură.

În ceea ce privește adenoamele secretante de PRL ambele grupuri studiate au avut un număr mai mic de cazuri pozitive comparativ cu alte studii populaționale similare [4, 53, 64]. Dacă Ezzat și colaboratorii au demonstrat o variabilitate a procentului de cazuri PRL pozitive cuprinse între 25 și 41% din cazuri [79] studiul nostru a evidențiat o variabilitate cuprinsă între 10 și 25%. Grupul „C” a fost caracterizat de cea mai mică valoare a adenoamelor PRL secretante raportat în literatură comparativ cu datele deja existente [302]. Aceasta poate fi considerată o particularitate a adenoamelor hipofizare din regiunea geografică a R. Moldova [47]. Chiar și pentru grupul „B” numărul de prolactinoame a fost mai mic decât cel din literatură. Fiind primul studiu comparativ derulat în Europa de sud-est și este vor mai fi necesare și alte investigații pentru elucidarea factorilor etiologici care determină aceste particularități. Ciccareli și colaboratorii au raportat variabilitatea adenoamelor hipofizare în dependență de vârstă și sex, dar nu și de regiunea geografică [45]. Date izolate privind procentajul variabilității geografice a prolactinoamelor au fost raportate recent de Pereira-Lima și colegii, care au relatat prezența prolactinoamelor în relație cu variabilitatea greutatei corporale în diferite regiuni ale Braziliei [241]. Studiile epidemiologice efectuate demonstrează că adenoamele ACTH secretante sunt cele mai puține la număr [79]. Majoritatea cercetărilor au elaborat date statistice cu privire la variabilitatea răspunsului clinic, etiologic și terapeutic, [149, 304] fiind mai puțin axate pe distribuția geografică și diferențele regionale.

În studiul populațional, Clayton și colab., a raportat aproximativ 10% din adenoame hipofizare sunt ACTH secretante, comparativ cu studiul similar a lui Daly pentru regiunea Liege, unde, procentul de adenoame ACTH secretoare a fost raportat ca fiind de aproximativ 6% din cazuri. Procentajul de adenoame ACTH secretante în ambele grupuri ale noastre a variat între 5 și 6%, care corespunde cu rezultatele studiului lui Daly, dar diferă de rezultatele lui Clayton.

Majoritatea adenoamelor hipofizare non-funcționale sunt producătoare de gonadotrofină [212], care reprezintă 30%-35% din tumorile pituitare [341]. Există puține date cu privire procentajul adenoamelor hipofizare LH pozitive din cauza evaluării acestora împreună cu adenoamele FSH secretante. În lotul C adenoame LH secretoare, au o frecvență de trei ori mai mare comparativ cu lotul B. Conform datelor noastre, procentul de adenoame LH secretoare, reprezintă cea mai mare valoare raportată până în prezent în literatura de specialitate, fiind constatat în 55% din cazuri în lotul C. Procentul de adenoame hipofizare non-secretante, în studiul nostru, a variat între 12,5% pentru lotul C și 17% pentru lotul B. Aceste valori au coincis

cu cele din studiul lui Dayl, dar au fost mai joase în comparație cu rezultatele raportate de Clayton în studiul menționat deja.

Adenoamele plurihormonale raportate în literatura de specialitate manifestă pozitivitate pentru cel puțin trei markeri evaluați în studiul, conținând de obicei, celulele TSH pozitive [297], dar adenoame hipofizare exclusiv TSH secretante au fost rareori identificate și publicate în literatura de specialitate ca fiind cazuri senzaționale [89, 101, 289]. Yamada et al, spre deosebire de aceștia, au raportat recent creșterea numărului adenoamelor TSH secretante în perioada ultimilor cinci ani, dar acest studiu a fost efectuat doar într-un singur centru în baza a 90 de cazuri [336].

Majoritatea asocierilor plurihormonale identificate în actualul studiu au fost caracterizate prin prezența GH-PRL-ACTH, în comparație cu datele din literatură care au raportat periodicitatea TSH în aceste asocieri. Deși, TSH a fost prezent ca un al patrulea hormon în aproximativ 15,56% din asocierile cvadruple a fost constatat în mod exclusiv doar în grupul C, în prezentul studiu.

6.2. Concluzii la capitolul 6

1. Prezenta lucrare pune în evidență dovezi impunătoare ale unui imunoprofil excepțional și specific al adenoamelor hipofizare, care își au originea în două regiuni diferite ale Europei de Est.
2. Adenoamele hipofizare din România au un imunoprofil care parțial corespunde cu cel descris în alte regiuni ale Europei.
3. Acest studiu a descris pentru prima dată imunoprofilul adenoamelor hipofizare provenite din Republica Moldova și spre deosebire de cele din partea de sud și de est a României au un imunoprofil diferit, caracterizat printr-un număr scăzut de prolactinoame și o creștere a adenoamelor LH secretoare.
4. Asocieri triple sau cvadruple identificate excepțional în lotul din Republica Moldova, ca fiind de o frecvență mai mare au completat profilul adenoamelor hipofizare. Diferențele menționate în lucrarea prezentă, generează întrebări cu privire la prezența unor factori etiologici sau epidemiologici regionali care pot să influențeze imunoprofilul adenoamelor hipofizare.

CONCLUZII GENERALE

1. Profilul hormonal al adenoamelor hipofizare în Republica Moldova se caracterizează printr-un număr scăzut de prolactinoame și o incidență înaltă de adenoame LH secretante, ceea ce diferă de România și alte zone geografice din Europa (capitolul 6.1.).
2. Asocierile hormonale triple și cvadruple au o incidență crescută pe teritoriul Republicii Moldova, fiind dominate de patternul solid acidofil și papilar bazofil (capitolul 6.1.).
3. Factorii moleculari cu un rol prognostic și terapeutic potențial în adenoamele hipofizare sunt următorii: două subtipuri moleculare de celule foliculostelate respectiv GFAP+/VEGF+/S100 și GFAP-/S100+/EGFR+, precum și varianta clasică GFAP+/S100+ (capitolul 4.2.).
4. Combinația S100+/EGFR+ are un comportament agresiv și o capacitate de invazie și recurență crescute, ceea ce denotă un pronostic nefavorabil în evoluția acestor tipuri de adenoame (capitolul 5.3.).
5. Factorii de creștere de tipul VEGF, PDGF se exprimă diferențiat în adenoamele hipofizare și au o corelație semnificativ statistică cu profilul hormonal (capitolul 5.1.).
6. Datele obținute sugerează existența unor forme moleculare distincte în cadrul acelorași forme histopatologice, care au un comportament diferit și un pronostic variabil, dependent de profilul molecular (capitolul 5).
7. Inițierea unei terapii personalizate țintite bazate pe expresia diferențiată a acestor markeri (GFAP, S100) ar putea îmbunătăți pronosticul pe termen lung al pacienților cu adenoame hipofizare, în special în cazul recurențelor (capitolul 4.2.).
8. Identificarea unor potențiali factori etiologici sau comportamentali locali, care pot să influențeze variabilitatea adenoamelor hipofizare, reprezintă o direcție de viitor al prezentului studiu (capitolul 6).
9. Identificarea expresiei și distribuției fracțiunii inhibitorii a VEGF și a EG VEGF,

influențează vascularizarea tumorilor și, respectiv, evoluția acestora (capitolul 5.1.).

10. Hibridizarea in situ a identificat VEGF, exprimat din punct de vedere proteic și genic, drept factor cu cele mai mari șanse de succes în vederea aplicării dublei terapii țintite, datorită expresiei sale în celulele tumorale și celulele folicular stelate (capitolul 5.1.).
11. Corelațiile factorilor de creștere cu profilul hormonal pot fi utile pentru realizarea unei reclasificări a adenoamelor hipofizare bazate pe aspectele moleculare, care permite o abordare clinică, diagnostică și terapeutică personalizată (capitolul 5).

RECOMANDĂRI PRACTICE

I. Pentru suport didactic și instructiv metodic:

1. Se recomandă utilizarea informației obținute la editarea manualelor de histologie, anatomie patologică, endocrinologie, oncochirurgie pentru studenți și rezidenții universităților de medicină precum și pentru instruirea postuniversitară.
2. Rezultatele investigațiilor curente prezintă o sursă de completare importantă pentru clasificarea tumorilor pituitare.
3. Datele obținute despre celulele folicular stelate, pot servi drept bază morfologică pentru cercetări clinice și experimentale complexe ale fiziologiei acestor structuri, studierea morfologiei funcționale a sistemului hipotalamo-pituitar, precum și la elaborarea noilor strategii și metode în tratamentul tumorilor de hipofiză.

II. Pentru clinicieni:

1. Cunoașterea profilului molecular al adenoamelor hipofizare permite inițierea unei terapii personalizate țintite bazate pe expresia diferențiată a acestor markeri ar putea îmbunătăți prognosticul pe termen lung al pacienților cu adenoame hipofizare, mai ales în cazul recurențelor.
2. Rolul fiziologic al celulelor folicular stelate este neclar, deși ar putea fi implicate în reglarea secreției hormonale. Configurația lor și prezența a numeroase granule de secreție sugerează faptul că ar putea fi derivate din celulele secretorii. Relația celule foliculare și celule folicular stelate este încă incomplet studiată.
3. Corelațiile factorilor de creștere cu profilul hormonal pot fi utile pentru realizarea unei reclasificări a adenoamelor hipofizare bazate pe un profil personalizat pentru fiecare pacient în parte, care să permită o stratificare clinică, diagnostică și terapeutică cât mai completă.

III. Pentru instituțiile de cercetare:

1. Pentru reducerea morbidității prin tumori hipofizare este necesar de a studia condițiile de mediu, care par a fi specifice pe teritoriul Republicii Moldova.
2. Identificarea expresiei și distribuției fracțiunii inhibitorii a VEGF precum și a EG VEGF, deschide noi teme de cercetare în domeniul adenoamelor hipofizare, în special pentru identificarea influențelor acestora asupra vascularizației particulare din adenoamele hipofizare, aspect incomplet elucidat până în prezent.

PLANURI DE CERCETĂRI PENTRU VIITOR

Rolul fiziologic al celulelor folicular stelate este neclar, deși ar putea fi implicate în reglarea secreției hormonale. Configurația lor și prezența a numeroase granule de secreție sugerează faptul că ar putea fi derivate din celulele secretorii. Relația celule foliculare și celule folicular stelate este încă incomplet studiată.

Identificarea unor potențiali factori etiologici sau comportamentali locali, care sa influențeze variabilitatea adenoamelor hipofizare, reprezintă o direcție de viitor al prezentului studiu.

Identificarea, pentru prima oară, a expresiei și distribuției fracțiunii inhibitorii a VEGF precum și a EG VEGF, deschide noi teme de cercetare în domeniul adenoamelor hipofizare, în special pentru identificarea influențelor acestora asupra vascularizației particulare din adenoamele hipofizare, aspect incomplet elucidat până în prezent.

Majoritatea cazurilor cu profil hormonal rar nu au fost caracterizate până în prezent din punct de vedere clinio-patologic și, acest fapt deschide noi orizonturi în domeniul cercetărilor patologiei hipofizare particularizat pentru Republica Moldova.

BIBLIOGRAFIE

1. Alfaidy N., Hoffmann P., Boufettal H., Samouh N., Aboussaouira T., Benharouga M., Feige J.J., Brouillet S. The Multiple Roles of EG-VEGF/PROK1 in Normal and Pathological Placental Angiogenesis. *Biomed Res Int.* 2014, 451906.
2. Ali L., Adeel A. Role of basal and provocative serum prolactin in differentiating idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delayed puberty diagnostic dilemma. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2012, Apr-Jun; 24(2):73-6.
3. Al-Shraim M., Asa S.L. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumours: what is new? *Acta Neuropathol.* 2006; 1–7.111(1).
4. Ambrosi B., Faglia G. Epidemiology of pituitary tumors. In: Faglia G., Beck-Peccoz P., Ambrosi B., Travaglini P., Spada A., editors. *Pituitary Adenomas: New Trends in Basic and Clinical Research.* Amsterdam. The Netherlands: Excerpta Medica. 1991; p. 159–161.
5. Arita K., Kurisu K., Tominaga A., Sugiyama K., Eguchi K., Hama S., Yoshioka H., Yamasaki F., Kanou Y. Relationship between intratumoral hemorrhage and overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in pituitary adenoma. *Hiroshima J Med Sci.* 2004; 53:23–7.
6. Arita K., Uozumi T., Kuwabara S., Mukada K., Kawamoto K., Takechi A., Onda J., Hara H., Egusa G. A case of pituitary adenoma producing both growth hormone (GH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH). *Endocrinol Jpn.* 1991, Jun; 38(3):271-8.
7. Arslan C., Dizdar O., Altundag K. Chemotherapy and biological treatment options in breast cancer patients with brain metastasis: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 2014, Aug; 15(12):1643-58.
8. Asa S.L., Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr. Rev.* 1998; 19:798–827.
9. Asa, S.L. and Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu. Rev. Pathol.* 2009; 4. 97–126.
10. Badiu C., Sava S. Endocrine tumour registry—tools for endocrine epidemiology. *Endocrine Abstracts.* 2007; 14: p. 502.
11. Baillie R., Carlile J., Pendleton N., Schor A. M. Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54, 116-120.
12. Bălinișteanu B., Ceaușu R.A., Cîmpean A.M., Baciuc I., Băculescu N., Coculescu M.,

- Raica M. Conventional examination versus immunohistochemistry in the prediction of hormone profile of pituitary adenomas. An analysis on 142 cases. *Rom J. Morphol. Embryol.* 2011; 52(3 Suppl):1041-5.
13. Bălinișteanu B., Cîmpean A. M., Ceaușu A. R., Corlan A. S., Melnic E. et al. High Ki-67 expression is associated with prolactin secreting pituitary adenoma. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, <https://www.bjbms.org/ojs/index.php/bjbms/article/view/1750/> vol. 17, no. 2 (2017), p. 104-108. IF 0,906.
 14. Bălinișteanu B., Cimpean A. M., Melnic E. et al. Crosstalk between tumor blood vessels heterogeneity and hormonal profile of pituitary adenomas: evidence and controversies. In: *Anticancer research*. Sithonia, Greece, 2014, no. 34(10), p. 5413-5420. IF 1,895.
 15. Balinisteanu B., Cimpean A. M., Melnic E. et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) A and PDGF B/PDGFR β axis in pituitary adenomas. In: *Virchows Archiv. European Journal of Pathology*, Belgrade, Serbia, 2015, vol. 467, supp.1, p. S212. IF 2,613.
 16. Bălu S., Pirtea L., Gaje P., Cîmpean A.M., Raica M. The immunohistochemical expression of endocrine gland-derived-VEGF (EG-VEGF) as a prognostic marker in ovarian cancer. *Rom J Morphol. Embryol.* 2012; 53(3):479-83.
 17. Barańska P., Jerczyńska H., Pawłowska Z. Vascular endothelial growth factor structure and functions. *Postępy Biochem.* 2005; 51, 13-21.
 18. Beck-Pecooz P., Brucker –Davis F., Persani L. et al. Thyrtropin-secreting pituitary tumors. *Endocrinol Rev.* 1996; 17:610-638.
 19. Bejcek B.E., Hoffman R.M., Lipps D., Li D.Y., Mitchell C.A., Majerus P.W., Deuel T.F. The v-sis oncogene product but not platelet-derived growth factor (PDGF) A homodimers activate PDGF alpha and beta-receptors intracellular and initiate cellular transformation. *J Biol Chem.* 1992, Feb; 15:267(5):3289-93.
 20. Benjamin L.E., Golijanin D., Itin A., et al. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest.* 1999; 103:159-165.
 21. Birman P., Michard M., Li J.Y., et al. Epidermal growth factor-binding sites, present in normal human and rat pituitaries, are absent in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65:275–281.
 22. Bloomer C.W., Kenyon L., Hammond E., et al. Cyclooxygenase- 2 (COX-2) and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) expression in human pituitary macroadenomas. *Am J Clin Oncol* 2003; 26(Suppl 2): S75–S80.

23. Bloomer C.W., Kenyon L., Hammond E., Hyslop T., Andrews D.W., Curran W.J., et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) and epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human pituitary macroadenomas. *Am. J. Clin. Oncol.* 2003; 26(4): S75–80.
24. Bonetti A., Giuliani J., Muggia F. Targeted agents and oxaliplatin-containing regimens for the treatment of colon cancer. *Anticancer Res.* 2014, Jan; 34(1):423-34.
25. Botelho C.H., Magalhaes A.V., Mello P.A., Schmitt F.C., Casulari L.A. Expression of p53, Ki-67 and c-erb B2 in growth hormone-and/or prolactin-secreting pituitary adenomas. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* 2006; 64:60–66.10.1590/S0004-282X2006000100013 [PubMed: 16622555].
26. Brochier S., Galland F., Kujas M., Parker F., Gaillard S., Raftopoulos C., Young J., Alexopoulou O., Maiter D., Chanson P. Factors predicting relapse of nonfunctioning pituitary macroadenomas after neurosurgery: a study of 142 patients. *Eur J Endocrinol.* 2010, Aug; 163(2):193-200.
27. Brouillet S., Hoffmann P., Alfaidy N., Feige J.J. Prokineticins: new regulatory peptides in human reproduction]. *Med Sci (Paris).* 2014, Mar; 30(3):274-9.
28. Brown L.F., Berse B., Jackman R.W., et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993; 53:4727-4735.
29. Brown L.F., Berse B., Jackman R.W., et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol.* 1995; 26:86-91.
30. Brown L.F., Berse B., Jackman R.W., et al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J. Pathol.* 1993; 143:1255-1262.
31. Brown L.F., Detmar M., Claffey K., et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A multifunctional angiogenic cytokine. 1997; *EXS* 79:233-269.
32. Budzik J., Omer S., Morris J.F., Christian H.C. Vascular endothelial growth factor secretion from pituitary folliculostellate cells: role of KATP channels. *J Neuroendocrinol.* 2014, Feb; 26(2):111-20.
33. Bussolati B., Dunk C., Grohman M., et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J. Pathol.* 2001; 159:993-1008.
34. Callahan R. Ado-Trastuzumab Emtansine in Metastatic HER2-Positive Breast Cancer. *J*

- Adv. Pract. Oncol. 2014, Mar; 5(2):134-9.
35. Camidge D.R., Pao W., Sequist L.V. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev. Clin. Oncol.* 2014. Jul; 1.doi: 10.1038/nrclinonc.2014.104.
 36. Carmeliet P., Moons L., Luttun A., et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 2001; 7:575-583.
 37. Carolina Cristina, María Inés Perez-Millan, Guillermina Luque, Raúl Ariel Dulce. VEGF and CD31 Association in Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol.* 2010; 21:154–160.
 38. Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS). Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States. 2004-2008. 2012; Hinsdale, Ill: CBTRUS.
 39. Chahal H. S., Chapple J. P., Frohman L. A., Grossman A. B., Korbonits M. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA) *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2010; 21(7):419–427. doi: 10.1016/j.tem.2010.02.007.
 40. Chaidarun S.S., Eggo M.C., Sheppard M.C., et al. Expression of epidermal growth factor (EGF), its receptor, and related oncoprotein (erbB-2) in human pituitary tumors an response to EGF in vitro. *Endocrinology* 1994; 135:2012–2021.
 41. Chaidarun S.S., Eggo M.C., Sheppard M.C., Stewart P.M. Expression of epidermal growth factor (EGF), its receptor, and related oncoprotein (erbB-2) in human pituitary tumors and response to EGF in vitro. *Endocrinology.* 1994, Nov;135(5):2012-21.
 42. Chanson P., Salenave S. Diagnosis and treatment of pituitary adenomas. *Minerva Endocrinol.* 2004, Dec; 29(4):241-75.
 43. Chhieng D. C., Tabbara S. O., Marley E. F., Talley L. I., Frost A. R.. Microvassel density and Vascular Endothelial Growth Factor expression in infiltrating lobular mammary carcinoma. *Breast J.* 2003; 9, 200-207.
 44. Childs G. V., Rougeau D., Unabia G. Corticotropin releasing hormone and epidermal growth factor: mitogens for anterior pituitary corticotropes. *Endocrinology.* 1995; 136, 1595–1602.
 45. Ciccarelli A., Daly A. F., Beckers A. The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary.* 2005; 8(1):3–6. doi: 10.1007/s11102-005-5079-0.
 46. Cimpean A. M, Ceauu A. R., Corlan A. S., Melnic E., Jitaru A. A., Raica M. The "game"

- of glial fibrillary acidic and S100 proteins in pituitary adenomas: two players or several, In: *Endocrinologia Polska*. 2017; https://journals.viamedica.pl/endokrynologia_polska/article/view/EP.a2017.0029/38597 DOI: 10.5603/EP. a2017.0029, 27 p. IF 1.341.
47. Cimpean A.M., Ceausu R.A., Gaje P. Effects of antibodies to EG-VEGF on angiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *In Vivo*. 2012 Sep-Oct; 26(5) :793-7.
 48. Cimpean A. M., Melnic E., Corlan A. M. et al. Heterogeneity of C ERB B family members expression is related to cell morphology and immunoprofile in pituitary adenomas. In: *Research and clinical medicine. The European Journal of Innovative, Integrative and Translational Medicine*, 2016, vol. 1, no. 1, p 33-39.
 49. Cimpean A.M., Melnic E., Bălinișteanu B., et al. Geographic-Related Differences of Pituitary Adenomas Hormone Profile: Analysis of Two Groups Coming from Southeastern and Eastern Europe, In: *International Jurnal of Endocrinology*. 2015; <https://www.hindawi.com/journals/ije/192094/>, 6 p. IF 2,510.
 50. Ciombor K.K., Berlin J. Targeting metastatic colorectal cancer - present and emerging treatment options. *Pharmgenomics Pers. Med.* 2014, Jul; 8; 7:137-44.
 51. Clarke M.J., Erickson D., Castro M.R., Atkinson J.L. Thyroid-stimulating hormone pituitary adenomas. *J Neurosurg*. 2008, Jul; 109(1):17-22.
 52. Clauss M., Weich H., Breier G., et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities: Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem*. 1996; 271:17629-17634.
 53. Clayton R. N. Sporadic pituitary tumours: from epidemiology to use of databases. *Baillière's Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999; 13(3):451–460.
 54. Cohen S. The epidermal growth factor (EGF). *Cancer*. 1983; 51:1787–1791.
 55. Coire C.I., Horvath E., Kovacs K., Smyth H.S., Ezzat S. Cushing's syndrome from an ectopic pituitary adenoma with peliosis: a histological, immunohistochemical, and ultrastructural study and review of the literature. *Endocr Pathol*. 1997; 8:65–74.
 56. Cooper O., Ben-Shlomo A., Bonert V., Bannykh S., Mirocha J., Melmed S. Silent corticogonadotrofh adenomas: clinical and cellular characteristics and long-term outcomes. *Horm Cancer*. 2010, Apr; 1(2):80-92.
 57. Cooper O., Melmed S. Subclinical hyperfunctioning pituitary adenomas: the silent tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012, Aug; 26(4):447-60.
 58. Cooper O., Vlotides G., Fukuoka H., Greene M.I., Melmed S. Expression and function of

- ErbB receptors and ligands in the pituitary. *Endocr Relat Cancer*. 2011, Oct 27; 18(6):R197-211.
59. Corlan A. S., Cimpean A. M., Melnic E. et al. Endocrine Gland-Derived Endothelial Growth Factor/Prokineticin – 1 in Cancer Development and Tumor Angiogenesis. In: *International Journal of Endocrinology* <https://www.hindawi.com/journals/ije/2017/3232905/abs/> volume 2017 (2017), Article ID 3232905, 13 p. IF 2,510.
 60. Corlan A. S., Melnic E., Cimpean A. M. et al. Her-2 and EGFR as potential and prognostic and therapeutic markers in pituitary adenomas. In: *Acta Endocrinologica. The international Journal of the Romanian Society of Endocrinology*, Braşov, Romania, 2016, vol. XII, supp 1, p. 40-41. IF 0,235.
 61. Courcoutsakis N. A., Tatsi C., Patronas N. J., Lee C.-C. R., Prassopoulos P. K., Stratakis C. A. The complex of myxomas, spotty skin pigmentation and endocrine overactivity (Carney complex): imaging findings with clinical and pathological correlation. *Insights into Imaging*. 2013; 4(1):119–133. doi: 10.1007/s13244-012-0208-6.
 62. Cretella D., Saccani F., Quaini F., Frati C., Lagrasta C., Bonelli M., Caffarra C., Cavazzoni A., Fumarola C., Galetti M., La Monica S., Ampollini L., Tiseo M., Ardizzoni A., Petronini P.G., Alfieri R.R. Trastuzumab emtansine is active on HER-2 overexpressing NSCLC cell lines and overcomes gefitinib resistance. *Mol Cancer*. 2014, Jun 5; 13:143. doi: 10.1186/1476-4598-13-143.
 63. Cross M., Dexter T.M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*. 1991; 64: 271–280.
 64. Daly A. F., Rixhon M., Adam C., Dempegioti A., Tichomirowa M. A., Beckers A. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liège, Belgium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006; 91(12):4769–4775. doi: 10.1210/jc.2006-1668.
 65. Davis J. R. E., Farrell W. E., Clayton R. N. Pituitary tumours. *Reproduction*. 2001; 121(3):363–371. doi: 10.1530/rep.0.1210363.
 66. Davis N.M., Sokolosky M., Stadelman K., Abrams S.L., Libra M., Candido S., Nicoletti F., Polesel J., Maestro R., D'Assoro A., Drobot L., Rakus D., Gizak A., Steelman L.S., McCubrey J.A. Dereglulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget*. 2014, Jul 15; five (13):4603-50.
 67. de Haas S., Delmar P., Bansal A.T., Moisse M., Miles D.W., Leighl N., Escudier B., Van

- Cutsem E., Carmeliet P., Scherer S.J., Pallaud C., Lambrechts D. Genetic variability of VEGF pathway genes in six randomized phase III trials assessing the addition of bevacizumab to standard therapy. *Angiogenesis*. 2014, Jul 11.
68. de Vries C., Escobedo J.A., Ueno H., et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 1992; 255:989-991.
 69. Denison F.C., Battersby S., King A.E., Szuber M., Jabbour H.N. Prokineticin-1: a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta. *Endocrinology*. 2008, Jul; 149(7):3470-7.
 70. Detmar M., Brown L.F., Berse B., et al. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest. Dermatol*. 1997; 108:263- 268.
 71. Deuel T.F., Kimura A., Maehama S., Tong B.D. Platelet-derived growth factor: roles in normal and v-sis transformed cells. *Cancer Surv*. 1985; 4(4):633-53.
 72. Devnath S., Inoue K. An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol*. 2008, Jun; 20(6):687-91.
 73. Driman D.K., Kobrin M.S., Kudlow J.E., Asa S.L. Transforming growth factor-alpha in normal and neoplastic human endocrine tissues. *Human Pathology*. 1992; 23:1360–1365.10.1016/0046-8177(92)90055-8 [PubMed: 1468772].
 74. Dvorak H. F., Orenstein, N. S., Carvalho A. C., Churchill, W. H., Dvorak A. M., Galli S. J., Feder J., Bitzer A. M., Rypysc J., Giovinco P. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumorsecreted products. *J. Immunol*. 1979; 122, 166-174.
 75. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995; 146:1029-1039.
 76. Dvorak H.F., Nagy J.A., Feng D., et al. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol. Immunol*. 1999; 237:97- 132.
 77. Ezzat S, Melmed S. The role of growth factors in the pituitary. *J Endocrinol Invest*. 2004; 13:691–698.
 78. Ezzat S., Asa S. L. The prevalence of pituitary adenomas.*Cancer* 101:613-619.
 79. Ezzat S., Asa S. L., Couldwell W. T., et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*. 2004; 101(3):613–619. doi: 10.1002/cncr.20412.

80. Ezzat S., Walpola I.A., Ramyar L., Smyth H.S., Asa S.L. Membrane-anchored expression of transforming growth factor-alpha in human pituitary adenoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1995; 80:534–539.10.1210/jc.80.2.534 [PubMed: 7852516].
81. Ezzat S., Zheng L., Smyth H.S., Asa S.L. The c-erbB-2/neu protooncogene in human pituitary tumours. *Clinical Endocrinology*. 1997; 46:599–606.10.1046/j.1365-2265.1997.1921003.x [PubMed: 9231056].
82. Félix I., Rodríguez Mendoza L., Guinto G., Torres Corzo J., Wussterhaus C. 120 biopsies of pituitary adenomas studied by immunohistochemistry and electron microscopy. A clinico-pathological correlation. *Gac Med Mex*. 1992; 128 (3): 289-95.
83. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol. Med*. 1999; 77:527-543.
84. Ferrara N., Henzel W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1989; 161, 851-858.
85. Ferreira J.E., de Mello P.A., de Magalhaes A.V., Botelho C.H., Naves L.A., Nose V., Schmitt F. Nonfunctioning pituitary adenomas: clinical features and immunohistochemistry. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2005; 63:1070–1078.10.1590/S0004-282X2005000600029 [PubMed: 16400431].
86. Folberg R., Hendrix M.J., Maniotis A.J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol*. 2000; 156:361–81.
87. Folkman J. What is the evidence that tumours are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82:4–6.
88. Fontana E., Gaillard R. Epidemiology of pituitary adenoma: results of the first Swiss study. *Revue Medicale Suisse*. 2009; 5(223):2172–2174.
89. Fujio S., Ashari, Habu M., Yamahata H., Moinuddin F.M., Bohara M., Arimura H., Nishijima Y., Arita K. Thyroid storm induced by TSH-secreting pituitary adenoma: a case report. *Endocr J*. 2014, Aug; 12.
90. Fukui S., Nawashiro H. and Otan, N. Vascular endothelial growth factor expression in pituitary adenomas. *Acta Neurochir. Suppl.*, 86: 519–21.
91. Fukumura D., Xavier R., Sugiura T., et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*. 1998, Sep 18; 94(6):715-25.
92. Fukuoka H., Cooper O., Ben-Shlomo A., Mamelak A., Ren S.G., Bruyette D., Melmed S.

- EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Invest*. 2011, Dec; 121(12):4712-21.
93. Fukuyama R., Shimizu N. Expression of epidermal growth factor (EGF) and the EGF receptor in human tissues. *J Exp Zool*. 1991; 258:336–343.
 94. Furtado S. V., Venkatesh P. K., Ghosal N., Hegde A. S. Coexisting intracranial tumors with pituitary adenomas: genetic association or coincidence? *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2010; 6(2):221–223. doi: 10.4103/0973-1482.65246.
 95. Gadelha M. R., Trivellin G., Hernández Ramírez L. C., Korbonits M. Genetics of pituitary adenomas. *Frontiers of Hormone Research*. 2013; 41:111–140. doi: 10.1159/000345673.
 96. Gagliano T., Filieri C., Minoia M., Buratto M., Tagliati F., Ambrosio M.R., Lapparelli M., Zoli M., Frank G., degli Uberti E., Zatelli M.C. Cabergoline reduces cell viability in non-functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion. *Pituitary*. 2013, Mar; 16(1):91-100,
 97. Garcia-Cardena G., Folkman J. Is there a role for nitric oxide in tumor angiogenesis? *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90:560-561.
 98. Georgitsi M., Raitila A., Karhu A., et al. Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007, 104(10), 4101–4105.
 99. Gille H., Kowalski J., Li B., et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2): A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol. Chem*. 2001; 276:3222-3230.
 100. Gittleman H., Ostrom Q. T., Farah P. D., et al. Descriptive epidemiology of pituitary tumors in the United States, 2004–2009. *Journal of Neurosurgery*. 2014; 121(3):527–535. doi: 10.3171/2014.5.jns131819.
 101. Glynn N., Agha A. Unexpected clinical course during treatment of a TSH-secreting pituitary adenoma. *Endocr Pract*. 2013, Jul-Aug; 19(4):e88-91.
 102. Goi T., Nakazawa T., Hirono Y., Yamaguchi A. Prokineticin 1 expression in gastrointestinal tumors. *Anticancer Res*. 2013, Dec; 33(12):5311-5.
 103. Goi T., Fujioka M., Satoh Y., Tabata S., Koneri K., Nagano H., Hirono Y., et al. Angiogenesis and tumor proliferation/metastasis of human colorectal cancer cell line SW620 transfected with endocrine glands-derived-vascular endothelial growth factor, as a new angiogenic factor. *Cancer Res*. 2004, Mar 15; 64(6):1906-10.
 104. Gospodarowicz D., Abraham J. A., Schilling J. Isolation and characterization of a vascular

- endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989; USA 86, 7311-7315.
105. Gospodarowicz D., Lau K. Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, Nov 30;165(1):292-8.
 106. Green A.R., Barros F.F., Abdel-Fatah T.M., Moseley P., Nolan C.C., Durham A.C., Rakha E.A., Chan S., Ellis I.O. HER2/HER3 heterodimers and p21 expression are capable of predicting adjuvant trastuzumab response in HER2+ breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014, May;145(1):33-44.
 107. Gruszka A., Kunert-Radek J., and Pawlikowski M. Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with pituitary adenomas. *Pituitary.* 2005; 8(2): 163–68.
 108. Gruszka A., Kunert-Radek J., Pawlikowski M., Stepień H. Serum endostatin levels are elevated and correlate with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with pituitary adenomas. *Pituitary.* 2005; 8(2):163-8.
 109. Gueorguiev M., Grossman A.B. Pituitary gland and b-catenin signalling: from ontogeny to oncogenesis. *Pituitary.* 2009; 12(3), 245–255.
 110. Guidi A.J., Abu-Jawdeh G., Berse B., et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87:1237-1245.
 111. Hackel P.O., Zwick E., Prenzel N., et al. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11: 184–189.
 112. Halper J., Parnell P.G., Carter B.J., Ren P., Scheithauer B.W. Presence of growth factors in human pituitary. *Laboratory Investigation.* 1992; 66:639–645. [PubMed: 1573857].
 113. Haouzi D., Mahmoud K., Fourar M., Bendhaou K., Dechaud H., De Vos J., Rème T., Dewailly D., Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod.* 2009 Jan; 24(1):198-205.
 114. Hardy J. Transphenoidal microsurgery of the normal and pathological pituitary. *Clin. Neurosurg.* 1969; 16:185–217.
 115. Harold F. Dvorak. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: A Critical Cytokine in Tumor Angiogenesis and a Potential Target for Diagnosis and Therapy, *J Clin. Oncol.* 2002; 20:4368-4380.
 116. Hatva E., Bohling T., Jaaskelainen J., et al. Vascular growth factors and receptors in

- capillary hemangioblastomas and hemangiopericytomas. *Am J Pathol.* 1996; 148:763-775, 48.
117. Hatva E., Kaipainen A., Mentula P., et al. Expression of endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases and growth factors in human brain tumors. *Am J Pathol.* 199; 5146:368-378.
 118. Heaney A.P., Melmed S. Molecular targets in pituitary tumours. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4(4), 285–295.
 119. Heldin C.H., Westermark B. Growth factors as transforming proteins. *Eur J Biochem* 1989; 184:487–496.
 120. Heymach J.V., Lockwood S.J., Herbst R.S., Johnson B.E., Ryan A.J. EGFR biomarkers predict benefit from vandetanib in combination with docetaxel in a randomized phase III study of second line treatment for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2014, Oct; 25(10):1941-8. doi: 10.1093/annonc/mdu269.
 121. Hidenori Fukuoka, Odelia Cooper, and Shlomo Melmed. HER2/ErbB2 Receptor Signaling in Rat and Human Prolactinoma Cells: Strategy for Targeted Prolactinoma Therapy. *Molecular Endocrinology.* 2011 January; 25(1):92-103.
 122. Hlatky L., Tsiou C., Hahnfeldt P., et al. Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Res.* 1994; 54:6083- 6086.
 123. Holthofer H, Virtanen I., Kariniemi A.L, Hormia M., Linder E., Miettinen A. Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest.* 1982; 47:60–66.
 124. Horvath E., Kovacs K. Gonadotroph adenomas of the human pituitary: sex-related fine-structural dichotomy. A histologic, immunocytochemical, and electronmicroscopic study of 30 tumors. *Am J Pathol.* 1984, Dec; 117(3):429-40.
 125. Horvath E., Kovacs K. The adenohypophysis. In: Kovacs K., Asa S. L. *Functional endocrine pathology.* Boston, 1991; p. 245-281.
 126. Horvath E., Kovacs K., Singer W., et al. Acidophil stem cell adenoma of the human pituitary: clinico-pathological analysis of 15 cases. *Cancer.* 1981; 47:761-771.
 127. Horvath E., Kovacs K., Smyth H.S., Cusimano M., Singer W. Silent adenoma subtype 3 of the pituitary—immunohistochemical and ultrastructural classification: a review of 29 cases. *Ultrastruct Pathol.* 2005; 29:511–524.
 128. Horvath E., Stefaneanu L., Kovacs K. Effect of dopamine agonist medication on prolactin

- producing adenomas a morphological study including immunocytochemistry, electron microscopy and in situ hybridization. *Wichows Arch A Pathol. Anat. Histopathol.* 1991; 418:439-446.
129. Horvath E., Kovacs K. Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastruct Pathol.* 2002, Jul-Aug; 26(4):219-28.
 130. Horvath E., Kovacs K. Ultrastructural diagnosis of human pituitary adenomas. *Microsc. Res. Tech.* 1992; 20:107-135.
 131. Houck K.A., Leung D.W., Rowland A.M., et al. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 1992; 267:26031-26037.
 132. Hsu D.W., Hakim F., Biller B.M., de la M.S., Zervas N.T., Klibanski A., Hedley-Whyte E.T. Significance of proliferating cell nuclear antigen index in predicting pituitary adenoma recurrence. *J Neurosurg.* 1993; 78:753–61.
 133. Huan C., Han T., Ju Y., Qu Y.M. Characteristics of mixed prolactin and adrenocorticotropin secreting pituitary adenomas and the differences in patients with merely prolactin-secreting adenomas. *Saudi Med J.* 2014 Mar; 35(3):248-54.
 134. Hussaini, I.M., Trotter, C., Zhao, Y., Abdel-Fattah, R., Amos, S., Xiao, A., et al. Matrix metalloproteinase-9 is differentially expressed in nonfunctioning invasive and noninvasive pituitary adenomas and increases invasion in human pituitary adenoma cell line. *Am. J. Pathol.* 2007; 170(1): 356–65.
 135. Iacovazzo D., Bianchi A., Lugli F., Milardi D., Giampietro A., Lucci-Cordisco E., Doglietto F., Lauriola L., De Marinis L. Double pituitary adenomas. *Endocrine.* 2013; 43(2):452-7.
 136. Ieni A., Barresi V., Caltabiano R., Cascone A.M., Del Sordo R., Cabibi D., Zeppa P., Lanzafame S., Sidoni A., Franco V., Tuccari G. Discordance rate of HER2 status in primary breast carcinomas versus synchronous axillary lymph node metastases: a multicenter retrospective investigation. *Onco Targets Ther.* 2014, Jul 11; 7:1267-72.
 137. Inoue K., Couch E.F., Takano K., Ogawa S. The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol.* 1999, Aug; 62(3):205-18.
 138. Itoh J., Serizawa A., Kawai K., Ishii Y., Teramoto A., Osamura R.Y. Vascular networks and endothelial cells in the rat experimental pituitary glands and in the human pituitary adenomas. *Microsc. Res. Tech.* 2003; 60:231–5.
 139. Jácome A.A., Wohnrath D.R., Scapulatempo Neto C., Carneseca E.C., Serrano S., Viana

- L.S., Nunes J.S., Martinez E.Z., Santos J.S. Prognostic value of epidermal growth factor receptors in gastric cancer: a survival analysis by Weibull model incorporating long-term survivors. *Gastric Cancer*. 2014 Jan; 17(1):76-86.
140. Jaffrain-Rea M.L., Petrangeli E., Lubrano C., et al. Epidermal growth factor binding sites in human pituitary macroadenomas. *J Endocrinol* 1998; 158: 425–433.
141. Jaffrain-Rea M.L., Petrangeli E., Lubrano C., Minniti G., Di Stefano D., Sciarra F., Frati L., Tamburrano G., Cantore G., Gulino A. Epidermal growth factor binding sites in human pituitary macroadenomas. *Journal of Endocrinology*.1998; 158:425-433. 10.1677 /joe.0.1580425 [PubMed: 9846172].
142. Jagannathan J., Dumont A.S., Jane J.A. Diagnosis and management of pediatric sellar lesions. *Front Horm. Res.* 2006; 34:83-104.
143. Jesser J., Schlamp K., Bendszus M. Pituitary gland tumors. *Radiologe*. 2014; 54(10):981–988.
144. Jiang X., Abiatari I, Kong B., Erkan M., De Oliveira T., Giese N.A., Michalski C.W., Friess H., Kleeff J. Pancreatic islet and stellate cells are the main sources of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 in pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2009; 9(1-2):165-72.
145. Johnson H., Del Rosario A.M., Bryson B.D., Schroeder M.A., Sarkaria J.N., White F.M. Molecular characterization of EGFR and EGFRvIII signaling networks in human glioblastoma tumor xenografts. *Mol Cell Proteomics*. 2012 Dec; 11(12):1724-40.
146. Joukov V., Kaipainen A., Jeltsch M., et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* 1997; 173:211-215.
147. Jugenburg M., Kovacs K., Stefanescu L., Scheithauer B.W. Vasculature in nontumorous hypophyses, pituitary adenomas, and carcinomas: a quantitative morphologic study. *Endocr. Pathol.* 1995; 6:115–2,.
148. Junqueira L. *Basic Histology*. 12th Ed. USA, 2010; MC Grow Hill.
149. Juszcak A., Ertorer M. E., Grossman A. The therapy of cushing's disease in adults and children: an update. *Hormone and Metabolic Research*. 2013; 45(2):109–117. doi: 10.1055/s-0032-1330009.
150. Kajikawa K., Yasui W., Sumiyoshi H., Yoshida K., Nakayama H., Ayhan A., Yokozaki H., Ito H., Tahara E. Expression of epidermal growth factor in human tissues. Immunohistochemical and biochemical analysis. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*. 1991; 418:27–32.10.1007/BF01600241.

151. Kanematsu T., Yano S., Uehara H., et al. Phosphorylation, but not overexpression, of epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Oncol Res* 2003; 13:289–298.
152. Kasselberg A.G., Orth D.N., Gray M.E., Stahlman M.T. Immunocytochemical localization of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1985; 33:315–322.10.1177/33.4.3884705 [PubMed: 3884705].
153. Key G., Becker M.H., Baron B., Duchrow M., Schlüter C., Flad H.D. & Gerdes J. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Laboratory Investigation*. 1993; 68: 629-639.
154. Knosp E., Kitz K., Perneczky A. Proliferation activity in pituitary adenomas: measurement by monoclonal antibody Ki-67. *Neurosurgery*. 1989; 25: 927-930.
155. Koch C.A., Anderson D., Moran M.F., et al. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 1991; 252:668–674.
156. Köhne C.H. Successes and limitations of targeted cancer therapy in colon cancer. *Prog Tumor Res*. 2014; 41:36-50.
157. Komaki R., Paulus R., Blumenschein G.R., Curran W.J. Robert F., Thariat J., Werner-Wasik M., Choy H., Hirsch F.R., Ang K.K. EGFR expression and survival in patients given cetuximab and chemoradiation for stage III non-small cell lung cancer: A secondary analysis of RTOG 0324. *Radiother Oncol*. 2014, Jul; 112(1):30-6. doi: 10.1016/j.radonc.2014.06.012.
158. Kontogeorgos G., Horvath E., Kovacs K. Sex-linked ultrastructural dichotomy of gonadotroph adenomas of the human pituitary: an electron microscopic analysis of 145 tumors. *Ultrastruct. Pathol*. 1990, Nov-Dec; 14(6):475-82.
159. Kontogeorgos G., Kovacs K., Horvath E., et al. Null cell adenomas, oncocytomas and gonadotroph adenomas in human pituitary: an immunohistochemical and ultrastructural analysis of 300 cases. *Endocrinol Pathol* 1993; 4:20-27.
160. Kontogeorgos G., Stefanescu L., Kovacs K., Cheng Z. Localization of Epidermal Growth Factor (EGF) and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Human Pituitary Adenomas and Nontumorous Pituitaries: An Immunocytochemical Study. *Endocr Pathol*. 1996; spring; 7(1):63-70.

161. Kovacs K., Horvath E. Tumors of pituitary gland. In: Atlas of tumor pathology, series2, fascicle 21 Semin Diagn Pathol. 1986, Feb; 3(1):69-82.
162. Kovacs K., Horvath E., Stefaneanu L., Bilbao J., Singer W., Muller P.J., Thapar K., Stone E. Pituitary adenoma producing growth hormone and adrenocorticotrofin: a histological, immunocytochemical, electron microscopic, and in situ hybridization study. Case report. J Neurosurg. 1998 Jun; 88(6):1111-5.
163. Kovacs K., Horvath E., Vidal S. Classification of pituitary adenomas. J Neurooncol. 2001; 54: 121-127.
164. Kowarik M., Onofri C., Colaco T., Stalla G.K., Renner U. Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor expression and function in folliculostellate pituitary cells. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 201, Feb; 118(2):113-20. doi: 10.1055/s-0029-1202832. Epub 2009 Apr 16.
165. Kuchenbauer F., Theodoropoulou M., Hopfner U., Stalla J., Renner U., Tonn J.C., Low M.J., Arzt E., Stalla G.K., Paez-Pereda M. Laminin inhibits lactotroph proliferation and is reduced in early prolactinoma development. Mol Cell Endocrinol. 2003; 207:13–20.
166. Kuiper J.L., Smit E.F. Challenges in the Management of EGFR -Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Patients with Acquired Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors. Oncology. 2014; 87(2):83-94.
167. Kümler I., Christiansen O.G., Nielsen D.L. A systematic review of bevacizumab efficacy in breast cancer. Cancer Treat Rev. 2014, Sep; 40(8):960-73. doi: 10.1016/j.ctrv.2014.05.006.
168. Lang R.A., Burgess A.W. Autocrine growth factors and tumorigenic transformation. Immunol Today. 1990; 11:244–249.
169. Lania A., Mantovani G., Spada A. Genetics of pituitary tumors: focus on G- protein mutations. Exp Bio Med. 2003; 228:1004-1017.
170. Lania A.G., Ferrero S., Pivonello R., Mantovani G., Peverelli E., Di Sarno A., Beck-Peccoz P., Spada A., Colao A. Evolution of an aggressive prolactinoma into a growth hormone secreting pituitary tumor coincident with GNAS gene mutation. J Clin Endocrinol Metab. 2010, Jan; 95(1):13-7.
171. Le Couter J., Ferrara N. EG-VEGF and Bv8. a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. Trends Cardiovasc. Med. 2003, Oct; 13(7):276-82.
172. Le Riche V.K., Asa S.L., Ezzat S. Epidermal growth factor and its receptor (EGF-R) in

- human pituitary adenomas: EGF-R correlates with tumor aggressiveness. *J Clin Endocrinol Metab.*1996; 81:656–662.
173. Lecoq A., Kamenický P., Guiochon-Mantel A., Chanson P. Genetic mutations in sporadic pituitary adenomas—what to screen for? *Nature Reviews Endocrinology.* 2014; 11(1):43–54. doi: 10.1038/nrendo.2014.181.
 174. Lee B.A., Donoghue D.J. Membrane-anchored form of v-sis/PDGF-B induces mitogenesis without detectable PDGF receptor autophosphorylation. *J Cell Biol.* 1991, Apr;113(2):361-70.
 175. Levy A. Stem cells, hormones, and pituitary adenomas. *J. Neuroendocrinol.* 2008; 20, 139–40.
 176. Levy A., Hall L., Yeudall W.A., Lightman S.L. p53 gene mutations in pituitary adenomas: rare events. *Clin Endocrinol.* 1994; 41:809–814.
 177. Li Q.F., Zhu H.Y., Yang Y.F., Liu J., Xiao F.J., Zhang Q.W., Wu C.T., Wang H., Wang L.S. Prokineticin-1/endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is a survival factor for human multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma.* 2010, Oct; 51(10):1902-12.
 178. Libermann T.A., Razon N., Bartal A.D., et al. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res* 1984; 44:753–760.
 179. Lloyd R. V. Advances in pituitary pathology: use of novel techniques. *Front. Horm. Res.* 2004; 32:146-174.
 180. Lloyd R. V., Gikas R. V., Chandler W. Prolactin and growth hormone-producing pituitary adenomas : an immunohistochemical and ultrastructural study. *Am J Pathol.* 1983; 7:251-260.
 181. Lloyd R.V., Fields K., Jin L., et al. Analysis of endocrine active and clinically silent corticotropic adenomas by in situ hybridization.*Am J Pathol.* 1990, 137:479-488.
 182. Lloyd R.V., Scheithauer B.W., Kuroki T., Vidal S., Kovacs K., Stefaneanu L. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Pituitary Adenomas and Carcinomas. *Endocr Pathol.* 1999; 10:229–35.
 183. Lloyd R.V., Vidal S., Horvath E., Kovacs K., Scheithauer B. Angiogenesis in normal and neoplastic pituitary tissues. *Microsc Res Tech.* 2003; 60:244–50.
 184. Lohrer P., Gloddek J., Hopfner U., Losa M., Uhl E., Pagotto U., Stalla G.K., Renner U. Vascular endothelial growth factor production and regulation in rodent and human pituitary tumor cells in vitro. *Neuroendocrinology.* 2001; 74:95–105.

185. Lubke D., Saeger W., Ludecke D.K. Proliferation markers and EGF in ACTH-secreting adenomas and carcinomas of the pituitary. *Endocrine Pathology*. 1995; 6:45–55.10.1007/BF02 914988 [PubMed: 12114689].
186. Luo X., Xie H., Long X., Zhou M., Xu Z., Shi B., Jiang H., Li. Z. EGFRvIII mediates hepatocellular carcinoma cell invasion by promoting S100 calcium binding protein A11 expression. *PLoS One*. 2013, Dec; 20;8(12):e83332.
187. Maartens N.F., Lopes M. B., Ellegala D., et al. Clinicopathological features and outcome in patients with mammosomatotroph adenomas. *Endocr Pathol*. 2001; 12:226.
188. Maldonado-Pérez D., Evans J., Denison F., Millar R.P., Jabbour H.N. Potential roles of the prokineticins in reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2007, Mar;18(2):66-72.
189. Martin V., Cappuzzo F., Mazzucchelli L., Frattini M. HER2 in solid tumors: more than 10 years under the microscope; where are we now? *Future Oncol*. 2014, Jun; 10(8):1469-86.
190. Martin-Lacave I., Utrilla J.C. Expression of a neu/c-erbB-2-like product I neuroendocrine cells of mammals. *Histology and Histopathology*. 2000; 15:1027–1033. [PubMed: 11005226].
191. Mastronardi L., Guiducci A., Spera C., Puzzilli F., Liberati F. Maira G. Ki-67 labelling index and invasiveness among anterior pituitary adenomas: analysis of 103 cases using the MIB-1 monoclonal antibody. *Journal of Clinical Pathology*. 1999; 52: 107-111.
192. Mavrakis A.N., Tritos N.A. Diagnostic and therapeutic approach to pituitary incidentaloma. *Endocrine Practice*. 2004; 10 438–444.
193. Mazarakis N., Kontogeorgos G., Kovacs K., Horvath E., Borboli N., Piaditis G. Composite somatotroph-ACTH-immunoreactive pituitary adenoma with transformation of hyperplasia to adenoma. *Pituitary*. 2001 Sep; 4(4):215-21.
194. McCabe C.J., Boelaert K., Tannahill L.A. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002; 87(9): 4238–44.
195. Meij B.P., Lopes M.B., Vance M.L., Thorner M.O., Laws E.R. Double pituitary lesions in three patients with Cushing's disease. *Pituitary*. 2000, Nov; 3(3):159-68.
196. Melnic E. Corelația imuno-morfologică în adenoamele hipofizare. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale*. Chișinău, 2016, vol. 1(50), p. 191-195. ISSN 1857-0011.
197. Melnic E. Profilul hormonal al adenoamelor hipofizare în Republica Moldova. În: *Revista de Științe ale Sănătății din Moldova, Chișinău*, 2016, vol. 2(8) p. 28-39. ISSN 2345-1467.

198. Melnic E. S100 protein expression in pituitary adenomas. În: Curierul Medical. Chișinău, 2016, vol. 59, nr. 2, p. 48-52. ISSN 1857-0666.
199. Melnic E. The heterogeneity of histological types of breast cancer: sources, reasons and practical application În: Curierul Medical. Chișinău, 2016, vol. 59, nr. 5, p 47-48. ISSN 1857-0666.
200. Melnic E. The influence of the tumoral cell proliferation rate in pituitary adenoma on expressing other factors with a prognostic role and therapeutic potential. În: Curierul Medical, Chișinău, 2015, vol. 58, nr. 4, p. 31-33. ISSN 1857-0666.
201. Melnic E. The role of VEGF 165b in pituitary adenomas pathogenesis. In : Research and clinical medicine, The European Journal of Innovative, Integrative and Translational Medicine, <http://www.resclinmed.eu/current-issue/> 2017, vol. 2, ISSUE 2. 5 p.
202. Melnic E. Tiparele de creștere și caracteristicile tinctoriale ale adenoamelor hipofizare: particularități identificate la populația Republicii Moldova. Studiu histopatologic descriptiv. În: Revista de Științe ale Sănătății din Moldova, Chișinău, 2015, vol. 6(4), p. 7-17. ISSN 2345-1467.
203. Melnic E., Cimpean A. M., Băliușteanu B. Comparative assessment of hormone immunoprofiles for pituitary adenomas coming from Romania and Republic of Moldova. In: Virchows Archiv. European Journal of Pathology. Belgrade, Serbia, 2015, vol. 467, supp.1, p. S73. IF 2,613.
204. Melnic E., Cimpean A. M., Gaje P. N. et al. Influence of hormone profile on vascular endothelial growth factor (VEGF A) expression in human pituitary adenomas. In: Anticancer research. Sithonia, Greece, 2014, no. 34(10) p. 5867. IF 1,895.
205. Melnic E., Foca E. Profilul imunohistochimic al adenoamelor hipofizare. Certitudini și controverse. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. Chișinău, 2016, vol. 1(50), p. 356-360. ISSN 1857-0011.
206. Meyer M., Clauss M., Lepple-Wienhues A., et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. EMBO J. 1999; 18:363-374.
207. Miao H.Q., Klagsbrun M. Neuropilin is a mediator of angiogenesis. Cancer Metastasis Rev. 2000; 19(1-2):29-37.
208. Miao H.Q., Lee P., Lin H., et al. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. FASEB J. 2000; 14:2532-2539.

209. Min H.S., Lee S.J., Kim S.K., Park S.H. Pituitary adenoma with rich folliculo-stellate cells and mucin-producing epithelia arising in a 2-year-old girl. *Pathol Int.* 2007, Sep; 57(9):600-5.
210. Mittelbronn M., Psaras T., Capper D., Meyermann R., Honegger J. ACTH- and prolactin-producing pituitary gland microadenoma with biphasic features of atypia and intermediate filament expression. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2006, Feb-Apr; 27(1-2):89-92.
211. Mohammed S., Syro L.V., Scheithauer B.W., Abad A., Uribe H., Rotondo F., Horvath E., Cusimano M., Kovacs K. Pituitary adenoma with peliosis: a report of two cases. *Endocr Pathol.* 2009; 20:41–5.
212. Molitch M.E. Nonfunctioning pituitary tumors. *Handb Clin Neurol.* 2014; 24:167-84.
213. Molitch M.E. Pituitary tumours: pituitary incidentalomas. *Best Pract Res Clin. Endocrinol .Metab.* 2009 Oct; 23(5):667-75.
214. Monsalves E., Larjani S., Loyola Godoy B., Juraschka K., Carvalho F., Kucharczyk W., Kulkarni A., Mete O., Gentili F., Ezzat S., Zadeh G. Growth patterns of pituitary adenomas and histopathological correlates. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99 (4): 1330-8.
215. Monson J. P. The epidemiology of endocrine tumours. *Endocrine-Related Cancer.* 2000; 7(1):29–36. doi: 10.1677/erc.0.0070029.
216. Morales A., Vilchis F., Chávez B., Chan C., Robles-Díaz G., Díaz-Sánchez V. Expression and localization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor(EG-VEGF) in human pancreas and pancreatic adenocarcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007, Oct;107(1-2):37-41.
217. Moshkin O., Syro L.V., Scheithauer B.W., Ortiz L.D., Fadul C.E., Uribe H., Gonzalez R., Cusimano M., Horvath E., Rotondo F., Kovacs K. Aggressive silent corticotroph adenoma progressing to pituitary carcinoma: the role of temozolomide therapy. *Hormones (Athens).* 2011, Apr-Jun;10(2):162-7.
218. Muller W., Saeger W., Wellhausen L., Derwahl K.M., Hamacher C., Ludecke D.K. Markers of function and proliferation in non-invasive and invasive bi- and plurihormonal adenomas of patients with acromegaly: an immunohistochemical study. *Pathology, Research and Practice.*1999; 195:595–603.
219. Muller Y.A., Li B., Christinger H.W., et al. Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad. Sci., U S A.* 1997; 94:7192-7197.

220. Namiecińska M., Marciniak K., Nowak J. Z. VEGF as an angiogenic, neurotropic, and neuroprotective factor. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2005; 59, 573-583.
221. Neumann P.E., Goldman J.E., Horoupian D.S., Hess M.A. Fibrous bodies in growth hormone-secreting adenomas contain cytokeratin filaments. *Arch Pathol. Lab Med.* 1985; 109:505–508.
222. Nicholson R.I., Gee J.M., Harper M.E. EGFR and cancer prognosis. *Eur J. Cancer.* 2001; 37:S9–S15.
223. Nielsen T.O., Friis-Hansen L., Poulsen S.S., Federspiel B., Sorensen B.S. Expression of the EGF family in gastric cancer: downregulation of HER4 and its activating ligand NRG4. *PLoS One.* 2014, Apr 11; 9(4):e94606.
224. Niveiro M., Aranda F.I., Peiro G., Alenda C., Pico A. Immunohistochemical analysis of tumor angiogenic factors in human pituitary adenomas. *Hum Pathol.* 2005;36:1090–5.
225. Nor J.E., Christensen J., Mooney D.J., Polverini P.J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol.* 1999; 154:375–84.
226. Nose-Alberti V., Mesquita M.I., Martin L.C., Kayath M.J. Adrenocorticotropin-producing pituitary carcinoma with expression of c-erbB-2 and high PCNA index: a comparative study with pituitary adenomas and normal pituitary tissues. *Endocrine Pathology.* 1998; 9:53–62.10.1007/BF02739952 [PubMed: 12114662].
227. Onder Onguru, Bernd Scheithauer W., Kalman Kovacs, Sergio Vidal^{1,3}, Long Jin, Shuya Zhang, Katharina H., Ruebel¹ and Ricardo V. Lloyd. Analysis of epidermal growth factor receptor and activated epidermal growth factor receptor expression in pituitary adenomas and carcinomas. *Modern Pathology.* 2004; 17, 772–780.
228. Onguru O., Scheithauer B.W., Kovacs K., Vidal S., Jin L., Zhang S., Ruebel K.H., Lloyd R.V. Analysis of epidermal growth factor receptor and activated epidermal growth factor receptor expression in pituitary adenomas and carcinomas. *Modern Pathology.* 2004; 17:772–780.doi:10. 1038/ modpathol.3800118. [PubMed: 15098012].
229. Onguru, O., Scheithauer, B.W., Kovacs, K., Vidal, S., Jin, L., Zhang, S., et al. Analysis of Cox-2 and thromboxane synthase expression in pituitary adenomas and carcinomas. *Endocr. Pathol.* 2004; 15(1): 17–27.
230. Onofri C., Theodoropoulou M., Losa M., Uhl E., Lange M., Arzt E., Stalla G.K., Renner U. Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in normal

- and adenomatous pituitaries: detection of a non-endothelial function of VEGF in pituitary tumours. *Journal of Endocrinology* 2006; 191 249–261.
231. Ortiz L.D., Syro .LV., Scheithauer B.W., Ersen A., Uribe H., Fadul C.E., Rotondo F., Horvath E., Kovacs K. Anti-VEGF therapy in pituitary carcinoma. *Pituitary*. 2012, Sep; 15(3):445-9.
 232. Otsuka F., Tamiya T., Yamauchi T., Ogura T., Ohmoto T., Makino H. Quantitative analysis of growth related factors in human pituitary adenomas. Lowered insulin-like growth factor-its receptor and I mRNA in growth hormone-producing adenomas. *Regulatory Peptides*. 1999; 83:31–38.10.1016/ S0167-0115(99)00048-8 [PubMed: 10498342].
 233. Ozawa S., Ueda M., Ando N., et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer*. 1989; 63:2169–2173.
 234. Pack S. D., Kirschner L. S., Pak E., Zhuang Z., Carney J. A., Stratakis C. A. Genetic and histologic studies of somatomammotrophic pituitary tumors in patients with the 'complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity and schwannomas' (Carney complex) *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000; 85(10):3860–3865.
 235. Pal S.K., Haas N.B. Adjuvant Therapy for Renal Cell Carcinoma: Past, Present, and Future. *Oncologist*. 2014, Jun; 26.pii: theoncologist.2014-0105.
 236. Parent A. D., Bebin J. Incidental pituitary adenomas. *J Neurosurg*. 1981, Feb; 54(2):228-31.
 237. Pasquali D., Santoro A., Bufo P., Conzo G., Deery W.J., Renzullo A., Accardo G., Sacco V., Bellastella A., Pannone G. Upregulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancers displaying infiltrative patterns, lymph node metastases, and BRAF mutation. *Thyroid*. 2011, Apr; 21(4):391-9.
 238. Pawlikowski M., Pisarek H., Jaranowska M. Immunocytochemical Investigations on the Vascularization of Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol*. 1997; 8:189–93.
 239. Pecozz P.B., Persani L. Thyrotrofin-secreting pituitary adenomas. Chapter 13b. <http://www.thyroidmanager.org/chapter/thyrotrofin-secreting-pituitary-adenomas>.
 240. Pei L., Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG).*Mol Endocrinol*. 1997; 11:433-441.
 241. Pereira-Lima J. F., Leães C. G., Neto F. M., Barbosa M. V., Silva A. L., Oliveira M. D. Hyperprolactinemia and body weight: prevalence of obesity and overweight in patients with hyperprolactinemia. *Research Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2013; 1, article 2 doi: 10.7243/2053-3640-1-2.

242. Perry A., Scheithauer B.W. Commentary: Classification and grading of pituitary tumors. Observations of two working neuropathologists. *Acta Neuropathol.* 2006; 111: 68–70.
243. Pinto A.C., Ades F., de Azambuja E., Piccart-Gebhart M. Trastuzumab for patients with HER2 positive breast cancer: delivery, duration and combination therapies. *Breast.* 2013, Aug; 22 Suppl 2:S152-5.
244. Pizarro C.B., Oliveira M.B., et al. Measurement of Ki-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MIB-1 monoclonal antibody. *Braz J Med Biol Res.* 2004, February; Volume 37(2) 235-243.
245. Pizarro C.B., Oliveira M.C., Pereira-Lima J.F, Leaes C.G., Kramer C.K., Schuch T., Barbosa-Coutinho L.M., Ferreira N.P. Evaluation of angiogenesis in 77 pituitary adenomas using endoglin as a marker. *Neuropathology.* 2009; 29:40–4.
246. Plate K.H., Breier G., Millauer B., et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 1993; 53:5822-5827.
247. Plate K.H., Risau W. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia.* 1995; 15:339- 347.
248. Plouët J., Schilling J., Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 1989, Dec.; 1;8(12):3801-6.
249. Plowman G.D., Culouscou J.M., Whitney G.S., Green J.M., Carlton G.W., Foy L., Neubauer M.G., Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *PNAS.* 1993; 90:1746–1750.10.1073/pnas.90.5.1746 [PubMed: 8383326.
250. Prezant T.R., Levine J., Melmed S. Molecular characterization of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic pituitary tumours. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:1388-1391.
251. Qi W., Li X., Zhang Y., Yao R., Qiu W., Tang D., Liang J. Overexpression of Her-2 upregulates FoxM1 in gastric cancer. *Int J Mol Med.* 2014, Jun; 33(6):1531-8.
252. Qian Z.R., Sano T., Asa S.L., Yamada S., Horiguchi H., Tashiro T., et al. Cytoplasmic expression of fibroblast growth factor receptor-4 in human pituitary adenomas: Relation to tumor type, size, proliferation, and invasiveness. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(4): 1904–11.
253. Raappana A., Koivukangas J., Ebeling T., Pirilä T. Incidence of pituitary adenomas in Northern Finland in 1992–2007. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2010; 95(9):4268–4275. doi: 10.1210/jc.2010-0537.

254. Raben D., Helfrich B.A., Chan D., et al. ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, alone and in combination with radiation and chemotherapy as a new therapeutic strategy in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2002; 29(Suppl 4):37–46.
255. Raica M., Căruntu I.-D., Cimpean A.-M., Suciuc C. *Histologia organelor.*, Ed. Lito. UMF „Victor Babeș” Timișoara, 2009.
256. Raica M., Coculescu M., Cimpean A.M., Ribatti D. Endocrine gland derived-VEGF is down-regulated in human pituitary adenoma. *Anticancer Res.* 2010, Oct; 30(10):3981-6.
257. Raica M., Mederle O., Căruntu I.D., Pinteș A., Chindriș A.M. *Histologie teoretică și practică.* Ed Brumar, Timișoara, 2003.
258. Rasul F.T., Jaunmuktane Z., Khan A.A., Phadke R., Powell M. Plurihormonal pituitary adenoma with concomitant adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and growth hormone (GH) secretion: a report of two cases and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien).* 2014, Jan; 156(1):141-6.
259. Raverot G., Jouanneau E., Trouillas J. Management of endocrine disease: clinicopathological classification and molecular markers of pituitary tumours for personalized therapeutic strategies. *Eur J Endocrinol.* 2014, Mar 13; 170(4):R121-32.
260. Ren L.N., Li Q.F., Xiao F.J., Yan J., Yang Y.F., Wang L.S., Guo X.Z., Wang H. Endocrine glands derived cellular endothelial growth factor protects pancreatic cancer cells from apoptosis via upregulation of the myeloid cell leukemia-1 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, Aug 14; 386(1):35-9
261. Renner U., Paez-Pereda M., Arzt E., Stalla G.K. Growth factors and cytokines: function and molecular regulation in pituitary adenomas. *Front Horm Res.* 2004; 32:96-109.
262. Renner U., Pagotto U., Arzt E., Stalla G.K. Autocrine and paracrine roles of polypeptide growth factors, cytokines and vasogenic substances in normal and tumorous pituitary function and growth: a review. *Eur J Endocrinol.* 1996, Nov; 135(5):515-32.
263. Restucci B., Papparella S., Maiolino P., De Vico G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 2002; 39, 488-493.
264. Riese D.J., Stern D.F. Specificity within the EGF family/ ErbB receptor family signaling network. *Bioessays.* 1998; 20:41–48.
265. Righi A., Agati P., Sisto A., Frank G., Faustini-Fustini M., Agati R., Mazzatenta D., Farnedi A., Menetti F., Marucci G., Foschini M.P. A classification tree approach for pituitary adenomas. *Hum Pathol.* 2012; 43:1627–1637.

266. Rivard A., Fabre J.E., Silver M., Chen D., Murohara T., Kearney M., Magner M., Asahara T., Isner J.M. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999; 99:111–20.
267. Roger Gejman, Brooke Swearingen E., Hedley-Whyte T. Role of Ki-67 proliferation index and p53 expression in predicting progression of pituitary adenomas. *Human Pathology*. 2008; 39:5, 758-766. Online publication date: 1-May-2008. [Crossref]
268. Roncaroli F., Scheithauer B.W., Cenacchi G., et al. Spindle cell oncocyoma of the adenohypophysis: a tumor of folliculostellate cells? *Am J Surg Pathol*. 200; 26:1048-1055
269. Rosen L. S. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control*. 2002; 9, 36-44.
270. Ryosuke Mori, Naoko Inoshita, Junko Takahashi-Fujigasaki, Tatsuhiro Joki, Hiroshi Nishioka, Toshiaki Abe, Takeshi Fujii, Shozo Yamada. Clinicopathological Features of Growth Hormone-Producing Pituitary Adenomas in 242 Acromegaly Patients: Classification according to Hormone Production and Cytokeratin Distribution. *Endocrinology*. 2013; 1-8 ISRN.
271. Sadler T.W. *Langman's medical embryology*. 10th ed. Philadelphia, Lippicott Williams&Wilkins; 2006.
272. Saeger W., Lüdecke D.K., Buchfelder M., Fahlbusch R., Quabbe H.J., Petersenn S. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol*. 2007, Feb; 156(2):203-16.
273. Sainsbury J.R., Farndon J.R., Needham G.K., et al. Epidermal growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet*. 1987; 1:1398–1402.
274. Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev. Oncol. Hematol*. 1995; 19:183–232.
275. Sánchez-Ortiga R., Sánchez-Tejada L., Moreno-Perez O., Riesgo P., Niveiro M., Picó Alfonso A.M. Over-expression of vascular endothelial growth factor in pituitary adenomas is associated with extrasellar growth and recurrence. *Pituitary*. 2013; Sep; 16(3):370-7.
276. Sano T., Kovacs K., Asa S.L., Yamada S., Sanno N., Yokoyama S., Takami H. Pituitary adenoma with "honeycomb Golgi" appearance showing a phenotypic change at recurrence from clinically nonfunctioning to typical Cushing disease. *Endocr Pathol*. 2002; 13(2):125-30.
277. Sano T., Mader R., Asa S.L., Qian Z.R., Hino A., Yamada S. "Honeycomb Golgi" in

- pituitary adenomas: not a marker of gonadotroph adenomas. *Endocr Pathol.* 2003; 14(4):363-8.
278. Sano T., Yamada S. Histologic and immunohistochemical study of clinically non-functioning pituitary adenomas; special reference to gonadotropin-positive adenomas. *Pathol Int.* 1994; 44:697-703.
 279. Scheithauer B.W., Horvath E., Kovacs K., et al. Plurihormonal pituitary adenomas. *Semin. Diagn. Pathol.* 1986; 3:69-82.
 280. Scheithauer B.W., Kovacs K.T., Laws Jr E.R., et al. Pathology of invasive pituitary tumors with special reference to functional classification. *J Neurosurg.* 1986; 65:733-744
 281. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000; 103:211–225.
 282. Schlingeman R.O., Rietveld F.J.R., de Waal R.M.W., Bradley N.J., Skene A.I., Davies A.J.S., Greaves M.F., Denekamp J., Ruiter D.J. Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest.* 1990; 62:690–696.
 283. Senger D. R., Galli S. J., Dvorak A. M., Perruzzi C. A., Harvey V. S., Dvorak H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; 219, 983-985.
 284. Senger D., Van De Water L., Brown L., et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 1993; 12:303-324.
 285. Senger D.R., Connolly D.T., Van De Water L., et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res.* 1990; 50:1774-1778.
 286. Shao S., Li X. Clinical features and analysis in 1385 Chinese patients with pituitary adenomas. *J Neurosurg Sci.* 2013, Sep; 57(3):267-75.
 287. Silver B.J. Platelet-derived growth factor in human malignancy. *Biofactors.* 1992, Apr; 3(4):217-27.
 288. Skorić T., Korsić M., Zarković K., Plavšić V., Besenski N., Breskovic L., Giljević Z., Paladino J. Clinical and morphological features of undifferentiated monomorphous GH/TSH-secreting pituitary adenoma. *Eur J Endocrinol.* 1999 Jun; 140(6):528-37.
 289. Song M., Wang H., Song L., Tian H., Ge Q., Li J., Zhu Y., Li J., Zhao R., Ji H.L. Ectopic TSH-secreting pituitary tumor: a case report and review of prior cases. *BMC Cancer.* 2014, Jul; 28: 14:544.
 290. Stewart C.F., Leggas M., Schuetz J.D., Panetta J.C., Cheshire P.J., Peterson J., Daw N.,

- Jenkins III J.J., Gilbertson R., Germain G.S., Harwood F.C., Houghton P.J. Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice. *Cancer Res.* 2004; 64:7491–7499. [PubMed]
291. Stiver S., Dvorak H. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF). *J Clin Ligand Assay.* 2000; 23:193-205.
 292. Sullivan N.J., Tashjian A.H. Platelet-derived growth factor selectively decreases prolactin production in pituitary cells in culture. *Endocrinology.* 1983 Aug; 113(2):639-45.
 293. Szala S., Radzikowski Cz. Molecular basis of neoplastic angiogenesis. *Nowotwory.* 1997; 47, 1-19.
 294. Tabata S., Goi T., Nakazawa T., Kimura Y., Katayama K., Yamaguchi A. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor strengthens cell invasion ability via prokineticin receptor 2 in colon cancer cell lines. *Oncol Rep.* 2013, Feb; 29(2):459-63.
 295. Takada K., Yamada S., Teramoto A. Correlation between tumor vascularity and clinical findings in patients with pituitary adenomas. *Endocr Pathol.* 2004; 15:131–9.
 296. Takahashi H., Shibuya M. The VEGF/VEGFR system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci.* 2005; 109(3):227-41.
 297. Teramoto A., Sanno N., Tahara S., et al. Pathological study of thyrotropin-secreting pituitary adenoma: plurihormonality and medical treatment. *Acta Neuropathol (Berl).* 2004; 108 (2): 147-53.
 298. Terman B.I., Carrion M.E., Kovacs E., et al. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1991; 6:1677-1683.
 299. Thapar K., Kovacs K., Scheithauer B.W., Stefanescu L., Horvath E., Pernicone P.J., Murray D., Laws E.R. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery.* 1996; 38:99–106.
 300. Theodoropoulou M., Arzberger T., Gruebler Y., Jaffrain-Rea M.L., Schlegel J., Schaaf .L, Petrangeli E., Losa M., Stalla G.K., Pagotto U. Expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic pituitary cells: evidence for a role in corticotropinoma cells. *J Endocrinol.* 2004, Nov; 183(2):385-94.
 301. Thorner M.O., Vance M.L., Laws E.R., et al. The anterior pituitary. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams Textbook of Endocrinology.* Philadelphia, Pa: WB Saunders. 1998; 249-340.
 302. Tjornstrand A., Gunnarsson K., Evert M., et al. The incidence rate of pituitary adenomas

- in western Sweden for the period 2001–2011. *European Journal of Endocrinology*. 2014; 171(4):519–526. doi: 10.1530/eje-14-0144.
303. Toi M., Inada K., Suzuki H., Tominaga T. Tumor angiogenesis in breast cancer: its association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat*. 1995; 36:193–204.
 304. Tritos N. A., Biller B. M. Cushing's disease. *Handbook of Clinical Neurology*. 2014; 124:221–234.
 305. Tritos N. A., Eppakayala S., Swearingen B., Hedley-Whyte E.T., Miller K.K., Nachtigall L.B., Grinspoon S.K., Biller B.M., Klibanski A. Pathologic and clinical features of pituitary adenomas showing TSH immunoreactivity. *Pituitary*. 2013, Sep; 16(3):287-93.
 306. Turner H.E., Harris A.L., Melmed S., Wass J.A. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev*. 2003; 24:600–32.
 307. Turner H.E., Nagy Z., Gatter K.C., Esiri M.M., Harris A.L., Wass J.A. Angiogenesis in pituitary adenomas - relationship to endocrine function, treatment and outcome. *J Endocrinol*. 2000; 165:475–81.
 308. Turner H.E., Nagy Z., Gatter K.C., Esiri M.M., Harris A.L., Wass J.A. Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85:1159–62.
 309. Turner H.E., Nagy Z., Gatter K.C., Esiri M.M., Wass J.A., Harris A.L. Proliferation, bcl-2 expression and angiogenesis in pituitary adenomas: relationship to tumour behaviour. *Br J Cancer*. 2000; 82:1441–5.
 310. Unsinn C., Neidert M. C., Burkhardt J., Holzmann D., Grotzer M., Bozinov O. Sellar and parasellar lesions—clinical outcome in 61 children. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2014; 123:102–108. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.04.026.
 311. Viacava P., Gasperi M., Acerbi G., Manetti L., Cecconi E., Bonadi A.G., Naccarato A.G., Acerbi F., Parenti G., Lupi I., Genovesi M., Martino E. Microvascular density and vascular endothelial growth factor expression in normal pituitary tissue and pituitary adenomas. *J Endocrinol. Invest*. 2003; 26:23–8.
 312. Vidal S., Horvath E, Kovacs K, Lloyd RV, Scheithauer BW. Microvascular structural entropy: a novel approach to assess angiogenesis in pituitary tumors. *Endocr Pathol* 14:239–47, 2003.
 313. Vidal S., Horvath E., Kovacs K., Kuroki T., Lloyd R.V., Scheithauer B.W. Expression of

- hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a) in pituitary tumours. *Histol. Histopathol.* 2003; 18(3), 679–686.
314. Vidal S., Kovacs K., Bell D., Horvath E., Scheithauer B.W., Lloyd R.V. Cyclooxygenase-2 expression in human pituitary tumours. *Cancer.* 2003;97(11), 2814–2821.
315. Vidal S., Kovacs K., Cohen S.M., Stefaneanu L., Lloyd R.V, Scheithauer B.W. Localization of vascular endothelial growth factor in nontumorous human pituitaries. Prolactinomas in D2R Knockout Mice. *Endocr Pathol* 1999; 10:109–122.
316. Vidal S., Kovacs K., Horvath E. et al. Topoisomerase IIa expression in pituitary adenomas and carcinomas: relationship to tumour behavior. *Mod. Pathol.* 2002; 15(11), 1205–1212.
317. Vidal S., Kovacs K., Horvath E., Scheithauer B.W., Kuroki T., Lloyd R.V. Microvessel density in pituitary adenomas and carcinomas. *Virchows Arch.* 2001; 438:595–602.
318. Vlotides G., Cooper O., Chen Y.H., Ren S.G., Greenman Y., Melmed S. Heregulin regulates prolactinoma gene expression. *Cancer Research.* 2009; 69:4209–4216. 1158/0008-5472.CAN-08-4934 [PubMed: 19401448].
319. Vlotides G., Eigler T., Melmed S. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr. Rev.* 2007; 28(2), 165–186.
320. Vlotides G., Siegel E., Donangelo I., Gutman S., Ren S.G., Melmed S. Rat prolactinoma cell growth regulation by epidermal growth factor receptor ligands. *Cancer Res.* 2008, Aug; 1;68(15):6377-86.
321. Vlotides G., Cooper O., Chen Y.H., Ren S.G., Greenman Y., Melmed S. Heregulin regulates prolactinoma gene expression. *Cancer Res.* 2009, May 15; 69(10):4209-16.
322. Waddell J.M., Evans J., Jabbour H.N., Denison F.C. CTGF expression is up-regulated by PROK1 in early pregnancy and influences HTR-8/Svneo cell adhesion and network formation. *Hum Reprod.* 2011, Jan; 26(1):67-75.
323. Wang P., Wang Y.G., Zhao W.J., Fu Y.D., Wang L., Wang F., Zhao S.H. The correlation between BRAF mutations, RET/PTC rearrangements and platelet-derived growth factor B expression in papillary thyroid carcinomas. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2012, Dec; 51(12):987-91.
324. Wang Q., Greene M.I. Mechanisms of resistance to ErbB-targeted cancer therapeutics. *J Clin Invest.* 2008; 118:2389–2392. [PMC free article] [PubMed].
325. Wang Y., Ji M., Wang W., Miao Z., Hou P., Chen X., Xu F., Zhu G., Sun X., Li Y., Condouris S., Liu D., Yan S., Pan J., Xing M. Association of the T1799A BRAF mutation with tumor extrathyroidal invasion, higher peripheral platelet counts, and over-expression

- of platelet-derived growth factor-B in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008, Mar;15(1):183-90.
326. Wang Y., Li J., Tohti M., Hu Y., Wang S., Li W., Lu Z., Ma C. The expression profile of Dopamine D2 receptor, MGMT and VEGF in different histological subtypes of pituitary adenomas: a study of 197 cases and indications for the medical therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014, Jul 16;33(1):56.
327. Watanabe Y., Lee S.W., Detmar M., et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene*. 1997; 14:2025-2032.
328. Weissinger SE, Keil P, Silvers DN, Klaus BM, Möller P, Horst BA, Lennerz JK. A diagnostic algorithm to distinguish desmoplastic from spindle cell melanoma. *Mod Pathol*. 2014 Apr; 27(4):524-34.
329. Westerman B.A., Blom M., Tanger E., van der Valk M., Song J.Y., van Santen M., Gadiot J., Cornelissen-Steijger P., Zevenhoven J., Prosser H.M., Uren A., Aronica E., van Lohuizen M. GFAP-Cre-mediated transgenic activation of Bmi1 results in pituitary tumors. *PLoS One*. 2012; 7(5):e35943.
330. Wizigmann-Voos S., Breier G., Risau W., et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res*. 1995; 55:1358- 1364.
331. Wöhrer A., Waldhör T., Heinzl H., et al. The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry. *Journal of Neuro-Oncology*. 2009; 95(3):401–411. doi: 10.1007/s11060-009-9938-9.
332. Wong M.P., Cheung N., Yuen S.T., et al. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int J Cancer*. 1999; 81:845-850.
333. Woolard J., Wang W.Y., Bevan H.S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R.O., Cui T.G., Sugiono M., Waine E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J.D. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*. 2004, Nov 1; 64(21):7822-35.
334. Wray S. From nose to brain: development of gonadotrophin-releasing hormone-1 neurones. *J Neuroendocrinol*. 2010, Jul; 22(7):743-53.
335. Xu M., Shorts-Cary L., Knox A.J., Kleinsmidt-Demasters B, Lillehei K, Wierman ME.

- Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) is over expressed in human pituitary tumours: role in proliferation and survival. *Endocrinology*. 2009; 150(5), 2064–2071.
336. Yamada S., Fukuhara N., Horiguchi K., Yamaguchi-Okada M., Nishioka H., Takeshita A., Takeuchi Y., Ito J., Inoshita N. Clinicopathological characteristics and therapeutic outcomes in thyrotropin-secreting pituitary adenomas: a single-center study of 90 cases. *J Neurosurg*. 2014, Sep; 19: 1-12.
337. Yamada S., Takada K. Angiogenesis in pituitary adenomas. *Microsc Res Tech* 2003; 60:236–243.
338. Yamaji T., Ishibashi M., Teramoto A., Fukushima T. Prolactin secretion by mixed ACTH-prolactin pituitary adenoma cells in culture. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 198,5 Apr; 108(4):456-63.
339. Yarman S., Kurtulmus N., Canbolat A., Bayindir C., Bilgic B., Ince N. Expression of Ki-67, p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) concomitantly in growth hormone-secreting pituitary adenomas; which one has a role in tumor behavior ? *Neuro Endocrinol Lett*. 2010; 31(6):823-8.
340. Yeane G. A., Brathwaite J. M., Dashnaw M. L., Vates G. E., Calvi L. M. Pituitary adenoma with mucin cells in a man with an unusual presentation of Carney complex. *Endocrine Pathology*. 2013; 24(2):106–109. doi: 10.1007/s12022-013-9247-x.
341. Yeh P.J., Chen J.W. Pituitary tumors: surgical and medical management. *Surg Oncol*. 1997; 6; (2): 67-92.
342. Zeng H., Dvorak H.F., Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2001; 276:26969-26979.
343. Zhang H., Berezov A., Wang Q., Zhang G., Drebin J., Murali R., Greene M.I. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117:2051-2058.
344. Zhang H., Berezov A., Wang Q., Zhang G., Drebin J., Murali R., Greene M.I. ErbB receptors: from oncogenes totargeted cancer therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2007; 51–2058. (doi:10.1172/JCI32278).
345. Zhang J., Wang P., Dykstra M., Gelebart P., Williams D., Ingham R., Adewuyi E.E., Lai R., McMullen T. Platelet-derived growth factor receptor- α promotes lymphatic metastases in papillary thyroid cancer. *J Pathol*. 2012 Oct; 228(2):241-50.

346. Zhang L., Yang N., Conejo-Garcia J.R., Katsaros D., Mohamed-Hadley A., Fracchioli S., Schlienger K., Toll A., Levine B., Rubin S.C., Coukos G. Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003, Jan; 9(1):264-72.
347. Zhao D., Tomono Y., Nose T. Expression of P27kip1 and Ki-67 in pituitary adenomas: an investigation of markers of adenoma invasiveness. *Acta Neurochirurgica.* 1999; 141: 187-192.
348. Zhao J., Chen Y., Huang Y., Long J., Wan F., Zhang S. Serum follicle-stimulating hormone level is associated with human epidermal growth factor receptor type 2 and Ki67 expression in post-menopausal females with breast cancer. *Oncol Lett.* 2013. Oct; 6(4):1128-1132.
349. Zhao W., Ren S.G. Neuregulin-1 (Nrg1) is mainly expressed in rat pituitary gonadotroph cells and possibly regulates prolactin (PRL) secretion in a juxtacrine manner. *J Neuroendocrinol.* 2011, Dec; 23(12):1252-62.
350. Zieliński G., Maksymowicz M., Podgórski J., Olszewski W.T. Double, synchronous pituitary adenomas causing acromegaly and Cushing's disease. A case report and review of literature. *Endocr Pathol.* 2013, Jun; 24(2):92-9.

DECLARAȚIA

Subsemnatul, Eugen Melnic, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctor habilitat sunt cercetări și realizări științifice proprii. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Melnic Eugen

Semnătura

21.06.2018



Informații personale

<i>Nume / Prenume</i>	Melnic Eugen
<i>Adresa</i>	Str. Botanica Veche, 8, ap. 7 Chisinau, MD 2065, R.Moldova
<i>Tel/fax</i>	serviciu: (+37322205424)
<i>Telefoane</i>	serviciu: (+37322205425), Mobil: (+373) 68 11 09 46
<i>e-mail</i>	eugen.melnic@usmf.md
<i>Sex</i>	masculin
<i>Data nașterii</i>	10 septembrie 1973
<i>Naționalitatea</i>	Republica Moldova
<i>Titlul științific</i>	Doctor în științe medicale, diploma seria DR nr.1842 din 25.12.2003
<i>Titlul științifico-didactic</i>	Conferențiar universitar, diploma seria CU nr. 0786 din 22.12.2011
<i>Abilitare</i>	Cu drept de conducător de doctorat, Certificat de abilitare seria CD nr. 2538 din 16.02.2017, specialitatea 311.02 – Morfopatologie
Experiența profesională	
<i>Perioada</i>	20 aprilie 2017 – prezent Seful Clinicii Morfopatologie Spitalul Clinic Republican Timofei Moșneaga, Chisinau
<i>Perioada</i>	2 septembrie 2015-prezent Șef al Catedrei de morfopatologie.
<i>Perioada</i>	13 februarie 2007- 2 septembrie 2015
<i>Funcția și postul ocupat</i>	Conferențiar universitar, Catedra de morfopatologie, USMF Nicolae Testemițanu, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova, Tel.: (+373) 22 243408, Fax: (+373) 22 242344, Email: contact@usmf.md

<i>Timpul activității</i>	<p>- Cursuri didactice și lucrări practice pentru studenți, rezidenți și medici la perfecționare, activitate științifică și curativă</p> <p>Seful Clinicii Morfopatologie Spitalul Clinic Republican Timofei Moșneaga, Chisinau, clinica recunoscuta pe plan național, deținând mai multe priorități nationale in domeniul diagnosticării morfologice de rutină, criodiagnosticării, etc.</p> <p>- Vicepreședinte al Comisiei MS pentru atestarea medicilor morfopatologi din R. Moldova</p> <p>- Membru al Seminarului de profil in Anatomia omului; Anatomia patologică; Histologie, citologie și embriologie; Medicină legală.</p> <p>- Membru in comisii de examene sau concursuri de specialitate;</p> <p>- Pregătire medici rezidenți si specialiști</p> <p>- Organizator de cursuri de perfecționare si formare medicala continua in anatomia patologica.</p>
Perioada	1 septembrie 1996 – 13 februarie 2003
Funcția și postul ocupat	Asistent universitar, catedra morfopatologie, USMF Nicolae Testemițanu, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, MD-2004, Chișinău, Republica Moldova, Tel.: (+373) 22 243408, Fax: (+373) 22 242344, Email: contact@usmf.md
<i>Timpul activității</i>	<p>- Cursuri didactice și lucrări practice pentru studenți, activitate științifică și curativă</p> <p>- Preocupari in ceea ce priveste cercetări în domeniul aterosclerozei, etc.</p> <p>- Preocupari in patologia cardio-vasculară</p>
Educație și formare	
Perioada	15.10. 2012 – 25.09.2014
<i>Calificarea/diploma obținută</i>	Master în Managementul Sănătății Publice, diploma SP nr. 000208 din 25.09.2014
<i>Discipline principale studiate</i>	Masterat în Managementul Sănătății Publice
<i>Numele și tipul instituției de învățământ</i>	Școala de management in Sănătate Publică, in cadrul IP USMF Nicolae Testemițanu.
Perioada	30 septembrie 1996 – 1 octombrie 1998
<i>Calificarea/diploma obținută</i>	Magistratură în domeniul morfopatologiei, diploma seria AM nr. 0024 din 22.10.1998
	Catedra morfopatologie, USMF Nicolae Testemițanu.
Perioada	01.09. 1990 – 26.06. 1996
<i>Calificarea/diploma obținută</i>	Medic generalist, diploma AL nr.010559.
<i>Discipline principale studiate</i>	Medicina generală
<i>Numele și tipul instituției de învățământ</i>	Facultatea de medicină generală, USMF Nicolae Testemițanu
Alte formări/instruiri	
03.11.-05.11.2017	<p>◆ Educație profesională continuă:</p> <p>✓ Al 10-lea Curs International de Patologie a Sistemului Digestiv Tara invitata: FRANTA, 10 credite.</p>
04.11-06.11.2016	<p>✓ Al 9-lea Curs International de Patologie a Sistemului Digestiv Tara invitata: MOLDOVA, 10 credite.</p>

10.11.-16.11.2016	✓ Maidstone and Tunbridge Wells NHS Trust, Cellular Pathology Department, Hermitage Lane, Maidstone, Kent ME16 9QQ, Cursuri de perfecționare în domeniul ginecopatologiei în cadrul screeningului cancerului de col uterin.
2017-prezent	✓ Proiectu global în domeniul dezvoltării patologiei “Rationalising the Moldovan National Cytopathology and Histopathology Laboratory Network and Building Capacities to Deliver High Quality Services Equitably Across the Republic of Moldova”, Royal College of Pathologists.
2017-prezent	✓ Proiectul EURASIA, Norvegia: Educație și cercetare în patologia orală.
2016-prezent	✓ Proiectul UE ERASMUS PLUS, Danemarca. Implementarea Instruirii bazată pe problemă
2016-prezent	✓ Proiect în domeniul neuropatologiei, Magdeburg, Germania.
01.05.-31.05.2015.	✓ Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, laboratorul de angieneză, Timișoara, Cursuri postuniversitare de perfecționare în imunohistochimie, diagnostic molecular, specialitatea morfopatologie.
01.05.-31.05.2014	✓ Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, laboratorul de angieneză, Timișoara, Cursuri postuniversitare de perfecționare în imunohistochimie, diagnostic molecular, specialitatea morfopatologie.
01.05.-31.05.2013	✓ Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, laboratorul de angieneză, Timișoara, cercetare în domeniul adenoamelor hipofizare, imunohistochimie, diagnostic molecular, specialitatea morfopatologie
	◆ Participări la conferințe:
15.05.2014	✓ Ședința societății Patologilor din Republica Moldova din 15.05.2014.
2014	✓ A noua conferință internațională de patologie Anticancer research, Sithonia, Grecia, 2014.
2015	✓ Virchows Archiv. Al 27 European Congress of Pathology, Belgrade, Serbia, 2015.
2015	✓ Prima conferință euroregională a doctoranzilor și tinerilor cercetători în domeniul biomedicinii. Timișoara, Romania, 2015.
2016	✓ Acta medica. Marisiensis al 14 National Symposium of Microscopic Morphology Târgu Mureș. Romania. 2016, p. 20.
2016	✓ Acta Endocrinologica. Common Congress of the Romanian Society of Endocrinology and Romanian Psychoneuroendocrine Society, Brașov, Romania, 2016.
2016	✓ Virchows Archiv. European Journal of Pathology, Koln, Germany 2016.
2017	✓ 19-th European Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal, 2017.
2017	✓ Cea de-a 68-a Conferință a Societății Neurochirurgilor din Germania și a 7-ea Conferință a Societății Britanice a Neurochirurgilor, Magdeburg, Germania, 2017.
2017	✓ Conferința aniversară IMSP Spitalul Clinic Republican „Timofei Moșneaga” la 200 ani de la fondare, 2017.
	Domeniul de activitate științifică
Specialitatea de bază	311.02. Anatomie patologică
Domenii de cercetare	Ateroscleroză. Adenoamele hipofizare
Tema tezei de doctorat	Rolul inflamației imune în aterogeneză
Tema tezei de doctor habilitat	Profilul hormonal și markeri moleculari predictivi pentru evoluția și terapia adenoamelor hipofizare
	Date statistice privind numărul total de publicații științifice și metodicodidactice

<i>Autor și coautor</i>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 52 articole și teze; ◆ 7 materiale ale comunicărilor științifice ◆ 2 ghiduri pentru studenți, rezidenți și farmaciști; ◆ 3 indicații metodice pentru studenți (autor); ◆ 1 monografie; 																				
Alte activități	<p>Vicepreședinte al Comisiei MS pentru atestarea medicilor morfopatologi din R.Moldova</p> <p>- Membru al Seminarului de profil în Anatomia omului; Anatomia patologică; Histologie, citologie și embriologie; Medicină legală.</p>																				
	Aptitudini și competențe personale																				
<i>Limba maternă</i>	Română																				
<i>Autoevaluare</i>																					
<i>Nivel european (*)</i>																					
<i>Rusa</i>																					
<i>Engleza</i>																					
	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th colspan="2">Înțelegere</th> <th colspan="2">Vorbire</th> <th>Scriere</th> </tr> <tr> <th>Ascultare</th> <th>Citire</th> <th>Participare la conversație</th> <th>Discurs oral</th> <th>Exprimare scrisă</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>C2</td> <td>C2</td> <td>C2</td> <td>C2</td> <td>C2</td> </tr> <tr> <td>B2</td> <td>B2</td> <td>B2</td> <td>B2</td> <td>B2</td> </tr> </tbody> </table>	Înțelegere		Vorbire		Scriere	Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral	Exprimare scrisă	C2	C2	C2	C2	C2	B2	B2	B2	B2	B2
Înțelegere		Vorbire		Scriere																	
Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral	Exprimare scrisă																	
C2	C2	C2	C2	C2																	
B2	B2	B2	B2	B2																	
	<i>(*) Nivelul Cadrului European Comun de Referință Pentru Limbi Străine</i>																				
<i>Competențe și aptitudini PC</i>	Windows, MS Office applications: Word, Excel, Power Point; Internet, Sisteme Informaționale Automatizate																				
<i>Competențe organizaționale/ manageriale</i>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Capacitate de analiză și sinteză. ◆ Responsabilitate. ◆ Punctualitate, ◆ lucru în echipă, ◆ planificare, ◆ coordonare 																				
<i>Competențe dobândite la locul de muncă</i>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ o bună cunoaștere a proceselor de control al calității (în prezent fiind responsabil cu auditul calității) 																				
<i>Informații suplimentare</i>	<p>Căsătorit, 1 copil.</p> <p>Permis de conducere - Categoria A, B, C, D</p>																				
Persoane de referință:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ababii Ion, dr.hab., prof. universitar, academician AȘ RM, iababii@usmf.md, tel. mob. (+373) 69107844. ▪ Vataman Vladimir, dr. șt. med., conferențiar universitar, vladimir.vataman@usmf.md, tel. mob. (+373) 796663305. 																				

Participări la forumuri științifice (naționale și internaționale)

1. Ședința societății Patologilor din Republica Moldova din 15.05.2014.
2. A noua conferință internațională de patologie Anticancer research, Sithonia, Grecia, 2014.
3. Virchows Archiv. Al 27 European Congress of Pathology, Belgrade, Serbia, 2015.
4. Prima conferință euroregională a doctoranzilor și tinerilor cercetători în domeniul biomedicinii. Timisoara, Romania, 2015.
5. Acta medica. Marisiensis al 14 National Symposium of Microscopic Morphology Târgu Mureș. Romania. 2016, p. 20.
6. Acta Endocrinologica. Common Congress of the Romanian Society of Endocrinology and Romanian Psychoneuroendocrine Society, Brașov, Romania, 2016.
7. Virchows Archiv. European Journal of Pathology, Koln, Germany 2016.
8. 19-th European Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal, 2017.
9. Cea de-a 68-a Conferință a Societății Neurochirurgilor din Germania și a 7-ea Conferință a Societății Britanice a Neurochirurgilor, Magdeburg, Germania, 2017.
10. Conferința aniversară IMSP Spitalul Clinic Republican „Timofei Moșneaga” la 200 ani de la fondare, 2017.

Lucrări științifice publicate

• Monografii monoautor

1. **Melnic Eugen.** Adenoamele hipofizare morfopatologie și profil molecular. Chișinău: ”Sirius”, 2017. 170 p. ISBN 978-9975-57-224-8.

• Articole în reviste științifice internaționale cotate ISI-Thomson și SCOPUS

2. Bălinișteanu B., Cimpean A. M., **Melnic E.** et al. Crosstalk between tumor blood vessels heterogeneity and hormonal profile of pituitary adenomas: evidence and controversies. In: Anticancer research. Sithonia, Greece, 2014, no. 34(10), p. 5413-5420. **IF 1,895.**
3. Cimpean A. M., **Melnic E.**, Bălinișteanu B. et al. Geographic-Related Differences of Pituitary Adenomas Hormone Profile: Analysis of Two Groups Coming from Southeastern and Eastern Europe, In: International Jurnal of Endocrinology <https://www.hindawi.com/journals/ije/> 2015/192094/, 6 p. **IF 2,510.**
4. Corlan A. S., **Melnic E.**, Cimpean A. M. et al. Her-2 and EGFR as potential and prognostic and therapeutic markers in pituitary adenomas. In: Acta Endocrinologica. The international Journal of the Romanian Society of Endocrinology, Brașov, Romania, 2016, vol. XII, supp 1, p. 40-41. **IF 0,235.**
5. Corlan A. S., Cimpean A. M., **Melnic E.** et al. Endocrine Gland-Derived Endothelial Growth Factor/Prokineticin – 1 in Cancer Development and Tumor Angiogenesis. In: International Jurnal of Endocrinology <https://www.hindawi.com/journals/ije/2017/3232905/abs/> volume 2017 (2017), Article ID 3232905, 13 p. **IF 2,510.**
6. Cimpean A. M., Ceașu A. R., Corlan A. S., **Melnic E.** et al. The „game” of glial fibrillary acidic and S100 proteins in pituitary adenomas: two players or several, In: Endocrinologia Polska, https://journals.viamedica.pl/endokrynologia_polska/article/view/EP.a2017.0029/38597/ DOI: 10.5603/EP.a2017.0029, 2017, 27 p. **IF 1.341.**
7. Bălinișteanu B., Cimpean A. M., Ceașu A. R., Corlan A. S., **Melnic E.** et al. High Ki-67 expression is associated with prolactin secreting pituitary adenoma. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, <https://www.bjbms.org/ojs/index.php/bjbms/article/view/1750/> vol. 17, no. 2 (2017), p. 104-108. **IF 0,906.**

• Articole în reviste științifice din străinătate recunoscute:

8. Cimpean A. M., **Melnic E.**, Corlan A. M. et al. Heterogenety of C ERB B family members

expression is related to cell morphology and immunoprofile in pituitary adenomas. In: Research and clinical medicine. The European Journal of Innovative, Integrative and Translational Medicine, 2016, vol. 1, no. 1, p 33-39.

9. **Melnic E.** The role of VEGF 165b in pituitary adenomas pathogenesis. In : Research and clinical medicine, The European Journal of Innovative, Integrative and Translational Medicine, <http://www.resclinmed.eu/current-issue/> 2017, vol. 2, ISSUE 2. 5 p.

• **Articole în revistele științifice din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei:**

- **categoria B**

10. **Melnic E.** The influence of the tumoral cell proliferation rate in pituitary adenoma on expressing other factors with a prognostic role and therapeutic potential. În: Curierul Medical, Chișinău, 2015, vol. 58, nr. 4, p. 31-33. ISSN 1857-0666.
11. **Melnic E., Raica M., Foca E. ș. a.** An alarm signal for the medical world addressed from the pathological anatomy service in the Republic of Moldova. În: Curierul Medical. Chișinău, 2015, vol. 58, nr. 3, p. 70-74. ISSN 1857-0666.
12. **Melnic E.** S100 protein expression in pituitary adenomas. În: Curierul Medical. Chișinău, 2016, vol. 59, nr. 2, p. 48-52. ISSN 1857-0666.
13. **Melnic E.** The heterogeneity of histological types of breast cancer: sources, reasons and practical application În: Curierul Medical. Chișinău, 2016, vol. 59, nr. 5, p 47-48. ISSN 1857-0666.
14. **Melnic E.** Corelația imuno-morfologică în adenoamele hipofizare. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale. Chișinău, 2016, vol. 1(50), p. 191-195. ISSN 1857-0011.
15. **Melnic E., Foca E.** Profilul imunohistichimic al adenoamelor hipofizare. Certitudini și controverse. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. Chișinău, 2016, vol. 1(50), p. 356-360. ISSN 1857-0011.

- **categoria C**

16. **Melnic E.** Tiparele de creștere și caracteristicile tinctoriale ale adenoamelor hipofizare: particularități identificate la populația Republicii Moldova. Studiu histopatologic descriptiv. În: Revista de Științe ale Sănătății din Moldova, Chișinău, 2015, vol. 6(4), p. 7-17. ISSN 2345-1467.
17. **Melnic E.** Profilul hormonal al adenoamelor hipofizare în Republica Moldova. În: Revista

de Științe ale Sănătății din Moldova, Chișinău, 2016, vol. 2(8) p. 28-39. ISSN 2345-1467.

• **Teze la forurile științifice internaționale**

18. **Melnic E.**, Cimpean A. M., Gaje P. N. et al. Influence of hormone profile on vascular endothelial growth factor (VEGF A) expression in human pituitary adenomas. [In: Anticancer research. Sithonia, Greece, 2014, no. 34\(10\) p. 5867. IF 1,895.](#)
19. Bălinișteanu B., Cimpean A. M., **Melnic E.** Expression of HER2 and EGFR in pituitary adenomas. In: First euroregional Conference for PhD students and young researchers in biomedicine. Timișoara, România, 2015, p. 42.
20. *Balinisteanu B., Cimpean A. M., Melnic E. et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) A and PDGF B/PDGFR β axis in pituitary adenomas. In: Virchows Archiv. European Journal of Pathology, Belgrade, Serbia, 2015, vol. 467, supp.1, p. S212. IF 2,613.*
21. **Melnic E.**, Cimpean A. M., Bălinișteanu B. Comparative assessment of hormone immunoprofile for pituitary adenomas coming from Romania and Republic of Moldova. In: Virchows Archiv. European Journal of Pathology. Belgrade, Serbia, 2015, vol. 467, supp.1, p. S73. **IF 2,613.**
22. Bălinișteanu B., Cimpean A. M., **Melnic E.** et al. Endocrine gland derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) expression in pituitary adenomas. In: Acta medica Marisiensis. 14TH National Symposium of Microscopic Morphology. Tîrgu-Mureș, România, 2016, p. 20.
23. Bălinișteanu B., Cimpean A. M., **Melnic E.** et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its inhibitor isoform VEGF165b: Dual role in pituitary adenomas. In: Virchows Archiv. European Journal of Pathology. Koln, Germany, 2016, vol. 469, supp.1, p. S175. **IF 2,613.**
24. Jitaru A. A., Cimpean A. M., **Melnic E.** et al. GFAP and protein S100 gameplay in pituitary adenomas; Single player or multiplayer configuration? In: Virchows Archiv. European Journal of Pathology. Koln, Germany, 2016, vol. 469, supp.1, p. S75. **IF 2,613.**
25. Jitaru A. A., Cimpean A. M., **Melnic E.** et al. From breast to „endocrine,, brain: The heterogenous expression of ErbB family members in pituitary adenomas. In: Virchows Archiv. European Journal of Pathology. Koln, Germany, 2016, vol. 469, supp.1, p. S75. **IF 2,613.**
26. Corlan A. S., Cimpean A. M, Raica M., **Melnic E.** et al. HER2, EGFR and PDGF family members as potential prognostic markers and their therapeutic implication. In: 19-th European Congress of Endocrinology. Lisbon, Portugal, 2017, vol. 49, p. 93.



Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 5552

Pentru inovația cu titlul

**„Protocolul tehnicii imunohistochimice manuale
cu utilizarea anticorpului Colagen IV, clona CIV
22, sistemul de vizualizare EnVision™ FLEX”**

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
“Nicolae Testemițanu”

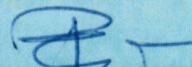
Se recunoaște calitatea de autor(i)

**David Valeriu , Șaptefrați Lilian, Petrovici
Vergil, Sinițina Lilia ,Cecoltan Svetlana,
Melnic Eugen, Renița Cristian**



Data eliberării 06 martie 2017 a.

L.Ș.


(Semnătură autorizată)