

STUDIO ISTOCCHIMICO, IMMUNOISTOCCHIMICO ED ULTRAISTRUTTURALE DI UN ADENOMA PSEUDOCROMOFOBO IPOFISARIO (Silent "Corticotroph" Adenoma subtype 2) DELLA *pars intermedia* IN UN CAVALLO¹

ROSSI G., NARDINI V*., VITALI C.G., TACCINI E., CANTILE C.,
BRACA G., RENZONI G.

Dipartimento di Patologia Animale Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Pisa.

() Istituto di Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Pisa.*

INTRODUZIONE

Nel cavallo sono descritti in letteratura reperti di neoplasie a carico dell'ipofisi ed in particolare viene sottolineata la maggior prevalenza dell'adenoma della *pars intermedia*.

Comunque, ritenendo ancora attuali le stime fatte negli anni settanta (1) secondo le quali la frequenza di questo tumore nei cavalli oscilla dallo 0,06% allo 0,12%, le neoplasie ipofisarie appaiono infrequenti.

Dal punto di vista clinico le neoplasie ipofisarie condizionano tre possibili evenienze derivanti da una alterazione morfologica e strutturale del parenchima ghiandolare ovvero: a) fenomeni di ipopituitarismo legati ad una compressione e conseguente atrofia della parte di parenchima rispettato e normalmente secernente; b) fenomeni di ipersecrezione di talune molecole ormonali; c) nessuna manifestazione quando si tratti di neoplasie poco o nulla secernenti e di limitata invasività (silent tumor).

Di particolare interesse e fonte di discussione è a tutt'oggi il problema classificativo di queste neoplasie.

MATERIALI E METODI

Un cavallo trotatore Belga maschio, castrone di anni 15, è stato soppresso a seguito di una serie di gravi manifestazioni cliniche, di natura neurologica, succedutesi nell'ultimo mese di vita. Dall'anamnesi prossima si è rilevata una epistassi ricorrente, cambiamento di indole, leggera poliuria e

1) Ricerche condotte con contributo MURST 40% anno 1993.

polidipsia (legate ad una forma nefritica progressiva), perdita di sensibilità del piano naso-labiale sinistro con apparente cecità monolaterale sullo stesso lato. Nell'ultima settimana di vita è stato inoltre descritto un comportamento aggressivo del soggetto (tentativi di rampare), una difficoltà nel bere ed una certa dismetria del passo sul bipede laterale sinistro durante la deambulazione. Si è rilevata anche una ipoestesia a livello del tronco peraltro limitata al lato sinistro.

L'ipofisi è stata prelevata in toto, fissata in formalina tamponata (pH 7,4) ed inclusa in paraffina per le indagini istomorfologiche (con le seguenti colorazioni: ematossina-eosina (E.E.), PAS, Rasmussen-Ignesti, Gabe modificata, Van Gieson) ed immunistochemiche (testando le sezioni per i seguenti antigeni: LH, FSH, TSH, GH, LTH, ACTH ed NSE) secondo il metodo Avidina-Biotina-Perossidasi, facendo uso della Diaminobenzidina (DAB) quale substrato cromogeno ed usando come controllo sezioni di ipofisi prelevate da un puledro di 8 mesi, morto per cause accidentali. Gli anticorpi utilizzati sono stati: rabbit anti ACTH (policlonale sintetico umano ACTH 1-24, diluito 1:300, Dako lotto n.o.040), anti-LTH (policlonale diluito 1:300), anti-FSH (policlonale diluito 1:200), anti-TSH (PLC diluito 1:800), anti-NSE (MCL diluito 1:100). Il Kit ABC-Perossidasi utilizzato è il Vectastain elite (Vector-Burlingame USA). In ogni prova sono stati allestiti preparati di controllo in cui è stato ommesso il trattamento con l'anticorpo (Ab) primario, che sono risultati sempre negativi nella fase successiva di sviluppo della reazione con la DAB.

Alcuni frammenti di tessuto prelevati nella zona rispettata, neoplastica e intermedia, sono stati inclusi in epon-araldite ed osservati al microscopio elettronico.

RISULTATI

Reperti necroscopici

Alla necroscopia non si evidenziavano macroscopicamente lesioni agli organi target degli ormoni ipofisari; anche gli altri distretti organici erano nella norma, fatta salva la presenza di alcuni focolai di fibrosi a carico di entrambi i reni e di fenomeni flogistici focali a carico dell'encefalo, di natura sicuramente parassitaria. L'asportazione dell'ipofisi dalla sua sede anatomica tramite resezione del diaframma della sella, permetteva di evidenziare un leggero aumento del volume complessivo della ghiandola. Sezionata sul piano sagittale mediano, la ghiandola presentava centralmente una zona circolare, di colore rossastro e di diametro di un centimetro circa. La

neoformazione era nettamente distinguibile dalla *pars distalis* (lobo anteriore) dell'adenoiipofisi che si estendeva in zona rostro-ventrale rispetto al nodulo. In seno alla neoformazione si poteva osservare una piccola area iperemico-emorragica a margini irregolari, di circa 2-3 millimetri di diametro localizzata ventro-caudalmente in seno al nodulo. La *pars nervosa* era, almeno macroscopicamente, rispettata.

Reperti microscopici

Una prima osservazione microscopica di sezioni colorate con E.E., mostrava la natura neoplastica benigna del nodulo intraipofisario. Nel complesso la massa risultava costituita da cordoni di cellule cilindriche o poligonali, con nucleo ovale relativamente grande e mediamente cromatico, che assumevano un aspetto a "nido" intorno alle strutture vascolari. La neoplasia risultava inoltre marginata rostro-ventralmente da un'esile pseudo-capsula connettivale (evidenziata molto bene dalla colorazione di Van Gieson) che la divideva dal lobo anteriore. Dorsalmente la massa sembrava confluire in alcuni punti nella *pars intermedia* residua; la parte nervosa appariva invece rispettata. Una esile rete di natura connettivale, con origine dalla capsula, si irradiava all'interno della massa e, insieme ai numerosi capillari, che per il diametro incostante e le numerose lacune formate assumevano l'aspetto di veri e propri sinusoidi, costituiva l'impalcatura su cui poggiavano le cellule neoplastiche. Lacune ematiche di maggiori dimensioni, riccamente infarcite di emazie, si osservavano ventro-caudalmente in seno all'area neoplastica.

Le cellule di forma quasi cilindrica e di dimensioni simili tra loro presentavano il rapporto nucleo/citoplasma costante (1:3 circa). I nuclei erano moderatamente basofili e a cromatina marginata; le figure mitotiche erano quasi assenti. Solo sporadiche cellule manifestavano una leggera eosinofilia del citoplasma ed una PAS positività della fine granulazione citoplasmatica, non comparabile con quella delle popolazioni cellulari basofile della *pars distalis*.

Istochimica

Mentre la colorazione con E.E. evidenziava, a fianco di una netta differenziazione tra elementi cellulari eosinofili ed elementi basofili presenti nella *pars distalis*, una lieve colorazione delle cellule neoplastiche, con il metodo Rasmussen-Ignesti si poteva osservare una netta distinzione tra le cellule acidofile, colorate in rosso brillante, e quelle basofile, colorate in azzurro cupo, della *pars distalis*. Le cellule in stadio di esaurimento funzio-

nale della *pars distalis* e quelle della neoplasia erano colorate appena in rosa pallido mostrando il loro aspetto cromofobo. Medesimi risultati si sono ottenuti con la colorazione di Gabe (metodo modificato). In questo caso le cellule del lobo anteriore sono state ben differenziate mentre le cellule dell'adenoma non hanno sviluppato nessuna reazione tintoriale specifica.

Immunoistochimica

Le prove immunoistochimiche sono state condotte utilizzando un pannello anticorpale comprendente i sei ormoni ipofisari, ed un antigene marker delle cellule nervose. I risultati delle prove immunoistochimiche sono di seguito sintetizzati in tabella.

Markers	FSH	LH	LTH	STH	TSH	ACTH	NSE
cellule tumorali	-	-	-	-	-	+/-	-
cellule orangiofile	-	-	+	-	-	-	-
cellule alfa	-	-	-	+	-	+++	-
cellule beta	-	-	-	-	+	-	-
cellule gamma	++	+++	-	-	-	-	-
pars nervosa	-	-	-	-	-	-	++
pars intermedia	-	-	-	-	-	++	-
follicoli colloide	-	-	-	-	-	+	-

Legenda: FSH = ormone follicolo stimolante, LH = o. luteinizante, LTH = o. luteotropo o prolattina, STH = o. somatotropo, TSH = o. tireotropo, ACTH = o. corticotropo, NSE = enolasi neuronale specifica.

Come si evince dalla stessa, le cellule tumorali non reagivano con nessun anticorpo, eccezion fatta per una debole ma diffusa ed uniforme positività espressa costantemente dalle cellule tumorali per l'Ab anti ACTH 1-24. Tale positività assumeva caratteri leggermente più marcati soltanto in cellule neoplastiche sporadiche ed isolate; ad un maggiore ingrandimento si notava una marcatura a ridosso della membrana citoplasmatica come osservato anche da Boujon et al (5).

Ultrastruttura

Le cellule neoplastiche si differenziavano nettamente sia dalle cellule del lobo anteriore dell'adenoipofisi, caratterizzate dall'aver un citoplasma ricco di granuli di secreto, a core più o meno elettrondenso delimitati da membrana, ora sparsi in maniera uniforme nel citoplasma (cellule somatotrope),

ora raccolti in prossimità di un polo della cellula (cellule ad LH) ora di dimensioni piuttosto ridotte (cellule a TSH) oppure polimorfi (cellule a LTH), sia da quelle della *pars intermedia*, abbastanza piccole, con nucleo irregolare, pochi mitocondri e numerosi granuli moderatamente elettrondensi. L'adenoma risultava infatti costituito da cellule per lo più di grandi dimensioni con nucleo indentato, citoplasma ricco di piccoli mitocondri di forma per lo più sferica e talora recanti anomalie soprattutto alle creste; pochi granuli moderatamente elettrondensi di dimensioni variabili, reticolo endoplasmatico rugoso (R.E.R.) poco rappresentato così come l'apparato del Golgi. Il nucleo delle cellule neoplastiche presentava uno o più nucleoli non prominenti con cromatina addensata in prossimità della membrana nucleare. Molto raro era il reperto di alcune cellule di dimensioni ridotte e con citoplasma ripieno di granuli fortemente elettrondensi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'applicazione delle metodiche immunoistochimiche (17) ed ultrastrutturali (8) è fondamentale per la formulazione di una corretta diagnosi delle neoplasie ipofisarie. E' infatti grazie all'utilizzo di queste tecniche che è stato possibile rivedere la vecchia classificazione in tumori basofili, acidofili e cromofobi in quanto molto riduttiva perchè basata essenzialmente su osservazioni di natura istochimica. E' noto infatti che molti casi di adenoma a cellule prolattiniche, un tempo ascritti agli adenomi cromofobi per la loro pressochè totale negatività alle più comuni colorazioni istochimiche (10, 16), vengono oggi inseriti tra gli adenomi acidofili; lo stesso dicasi per molti adenomi a cellule corticotrope (11). L'adenoma francamente cromofobo che un tempo era considerato il tipo di neoplasia ipofisaria più comune, sembra addirittura non esistere o, secondo alcuni Autori, essere rappresentato esclusivamente dai cosiddetti "null cell adenoma" o adenomi fetali (18), molto rari e caratterizzati da cellule povere di granuli di secreto o totalmente prive e povere di organuli cellulari. Accanto ai classici adenomi acidofili e basofili è più corretto quindi parlare di adenomi ipofisari pseudocromofobi per indicare quei tumori che all'istochimica presentano cellule con modesta affinità tintoriale. Il tumore da noi studiato può quindi essere inquadrato tra gli adenomi pseudocromofobi secondo la classificazione di Lanza (13) o tra gli adenomi cromofobi non secernenti secondo la classificazione di Capen (6, 7) e Zaki (19). Per la classificazione di questa neoplasia abbiamo utilizzato i criteri della patologia umana dato che in veterinaria tale classificazione è molto meno dettagliata, non comprendendo una

grande varietà di sottotipi nell'ambito della stessa neoplasia.

Secondo la classificazione di Moulton (14) e secondo quella più recente di Capen (7), che privilegia la sede di insorgenza del tumore piuttosto che la sua morfologia cellulare, l'adenoma rientra semplicemente negli adenomi della *pars intermedia*. Secondo la morfologia cellulare ed il comportamento della neoplasia, atipico rispetto alle caratteristiche ultrastrutturali individuabili nell'adenoma della *pars intermedia* - assenza quasi totale di granuli di secreto, ricchezza in mitocondri, sviluppo limitato del R.E.R e dell'apparato di Golgi nonché totale assenza dei segni clinici regolarmente descritti in associazione a questo tipo di adenoma (9, 4, 2, 11, 3, 15) - ci è sembrato più corretto applicare la classificazione utilizzata in patologia umana da Lanza (13) e Kovacs e Horvath (11), basata essenzialmente sulla individuazione degli aspetti citomorfofunzionali degli elementi cellulari costituenti la neoplasia. In base a questa classificazione l'adenoma rientrerebbe tra gli adenomi pseudocromofobi o adenomi corticotropi.

All'esame ultrastrutturale l'adenoma da noi studiato è risultato morfologicamente riconducibile al "*silent corticotroph adenoma subtype 2*" in accordo con quanto descritto da Kovacs e Horvath (1). Anche nel nostro caso abbiamo osservato la presenza di clusters di cellule immature paragonabili a quelle rinvenibili nel "*null cell adenoma*". Il reperto indica un alto grado di immaturità delle cellule neoplastiche nelle quali si possono reperire sporadici granuli di secreto e numerosi mitocondri, caratterizzati da un certo polimorfismo e da fenomeni alterativi a livello delle creste. Questi aspetti ultrastrutturali ricordano la struttura tipica dell'adenoma non secernente di tipo oncocitario, come descritto da Landolt e Oswald (12). Gli sporadici granuli di secreto osservati al M.E. sono risultati essere di natura peptidica e, con molte probabilità ACTH simile; si presuppone in ogni caso che si tratti di granuli contenenti peptidi derivati dalla Proopiomelanocortina (POLMC), data la loro reattività agli anticorpi anti ACTH (catena 1-24 che, secondo Kovacs e Horvath (11) ha una bassa specificità di reazione se paragonato all'Ab che riconosce la catena 1-39 o 17-39 dell'ACTH, interagendo con la prima frazione di quasi tutti i POLMC derivati).

L'immunoistochimica ha poi confermato questi reperti ultrastrutturali in quanto la neoplasia ha espresso una debole ma uniforme positività al siero anti ACTH. Una positività debole ed uniforme per l'anticorpo anti ACTH è stata espressa anche dalla *pars intermedia* dell'ipofisi; tale positività è legata alla cross-reattività dell'Ab anti ACTH con le molecole polipeptidiche

POLMC-derivate le quali presentano alcune sequenze aminoacidiche identiche. Nella maggior parte dei cavalli infatti la *pars intermedia* ed, in misura minore, alcune aree della *pars distalis* producono la molecola-precursore POLMC che reagisce in maniera aspecifica con Ab specifici verso molti peptidi quali l'ACTH, l' α , β o γ , MSH, la β LPH, il CLIP (Peptide Corticotropin Simile della Parte Intermedia), molecole tutte da essa derivate dopo fenomeni di clivaggio.

La presenza dell'adenoma pseudocromofobo a cellule ACTH secernenti della *pars Intermedia*, nel nostro caso non ha prodotto alcuna sintomatologia clinica riferibile ad un quadro di PDH (Pituitary Dependent Hyperadrenocorticism), differente dalla malattia di Cushing, frequentemente descritta nel cane come più diretta conseguenza di adenoma cromofobo pituitario. Ciò è da ritenersi correlato alle ridotte dimensioni dell'adenoma (appena un cm. di diametro) ed all'esiguo numero di cellule effettivamente secernenti in esso presenti.

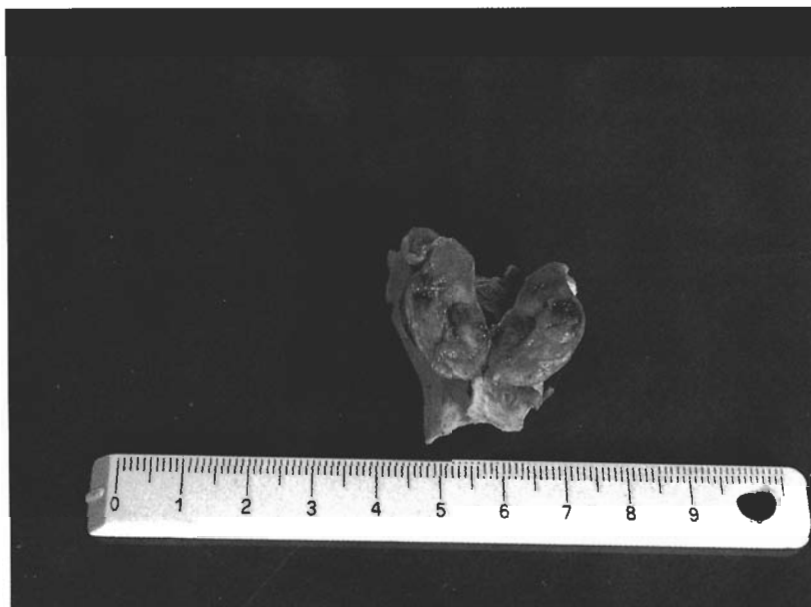


Fig. 1 - Ipofisi. La lesione neoplastica appare come formazione rotondeggiante, con area discromica emorragica, senza marcate modificazioni di volume della ghiandola.

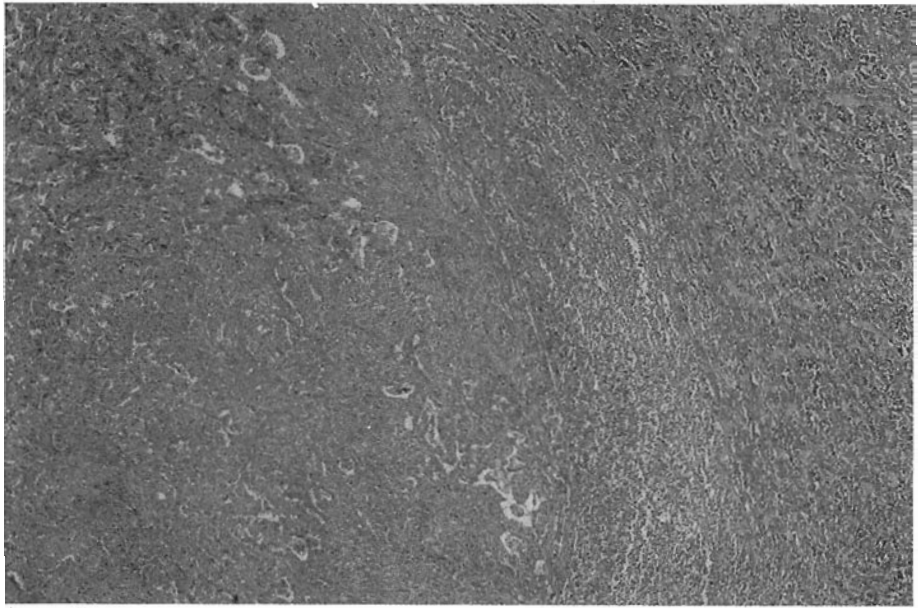


Fig. 2 - Ipofisi. Coloraz. E-E. Piccoli ingrandimenti. E' documentata la netta delimitazione tra massa neoplastica, in cui si evidenzia un apparente quadro emorragico, e la parte del tessuto rispettato.

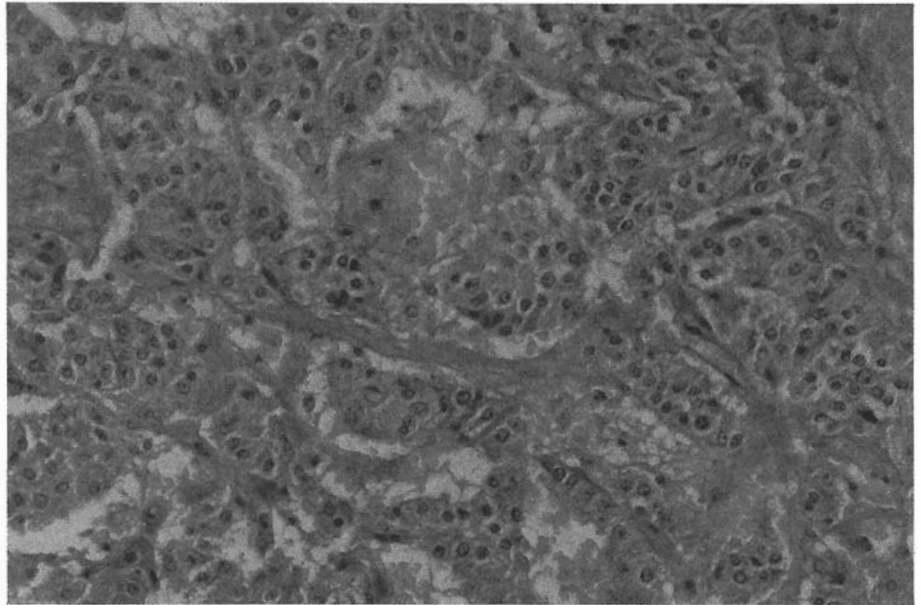


Fig. 3 - Ipofisi. Coloraz. E-E. Forti ingrandimenti. L'organizzazione tumorale appare di tipo lobulare con delicata ma evidente trama connettivale. Inoltre si apprezza il fenomeno di replezione ematica in strutture sinusoidi ed in formazioni lacunari angioectasiche o francamente emorragiche.

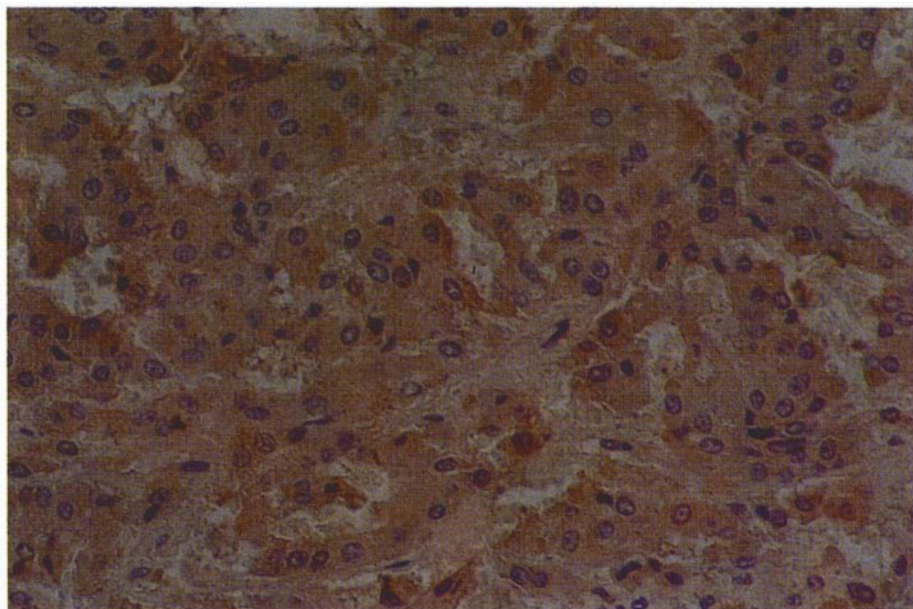


Fig. 4 - Ipofisi. Immunoreazione ABC-Perossidasi, substrato DAB, colorazione nucleare con Ematossilina di Harris. Forti ingrandimenti. La reazione immunocistochemica evidenzia una debole positività in gran parte delle cellule tumorali mentre alcune reagiscono più intensamente all'anticorpo per ACTH.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Auer D E., Wilson R.G., Groenedyk S., Filippich L.J. (1987). *Glucose metabolism in a pony mare with a tumor of the pituitary gland pars intermedia*. Australian Vet. Jour., 64, no.12, 379-382.
- 2) Bestetti G.E., Abramo F., Guillaume-Gentil C., Rohner-Jeanrenaud F., Rossi G.L. (1990). *Changes in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of genetically obese fafa rats: a structural, immunocytochemical, and morphometrical study*. Endocrinology 123, 1880-1887.
- 3) Boly H., Humbolt P., Tillet Y , Thibier M.: (1994). *Effects of Trypanosoma congolese infection on the pituitary gland of Baulé bulls: immunohistochemistry of LH-and FSH-secreting cells and response of plasma LH and testosterone to combined dexamethasone and GnRH treatment*. J.of Reproduction and Fertility: 100, 157-162.
- 4) Boujon C.E., Ritz U., Rossi G.L., Bestetti G.E. (1991). *A clinico-pathological study of caninae Cushing's disease caused by a pituitary carcinoma*: J. Comp. Pathol; 105, 353-364.
- 5) Boujon C.E., Bestetti G.E., Meier H.P., Straub R., Junker U., Rossi G.L. (1993). *Equine pituitary adenoma: a functional and morphological study*. J. Comp. Pathol, 109, 163-178.

- 6) Capen C.C., Martin, S.L et al. (1976). *A neoplasm in the adenohypophysis of dogs: a clinical and pathologica study*. Path. Vet. 4, 301-325
- 7) Capen C.C., *The endocrine glands*: in Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, eds Pathology of domestic animals. Orlando, Fla Academic Press Inc. (1993); pagg.272-285.
- 8) Ghadially F.N. in: *Diagnostic electron microscopy of tumors*; II° ed. Butterworth Tsh & Co. (Publishers LTD 1985)
- 9) Horvath C.J., Ames T.R., Metz A.L., Larson V.L. (1988). *Adrenocorticotropin-containing neoplastic cells in a pars intermedia adenoma in a horse*: JAVMA, 192, 3, 367-371
- 10) Kovacs K., Coremlum B., Sierek A.M.T., Penz G., Ezrin C. (1976). *Localization of prolactin in chromophobe pituitary adenomas; study of human necropsy material by immunoperoxidase technique*. J. Clin. Pathol. 29; 250-258.
- 11) Kovacs K. and Horvath E.: *Tumors of the Pituitary Gland*. Armed forces institute of Pathology, Washington (1983)
- 12) Landolt A.N., Oswald U.W., (1973). *Histology and ultrastructure of an oncocytic adenoma of the human pituitary*. Cancer 31, 1099-1105, 1973.
- 13) Lanza G.: *Istopatologia dei tumori*; Piccin Editore Padova, 1980.
- 14) Moulton J.E.: *Tumors in Domestic animals*; second edition (1978). University of California press. Edit by Jack E. Moulton.
- 15) Peterson M.E., Krieger D.T., Drucker W.D., Halmi N.S. (1982). *Immunocytochemical study of the hypophysis in 25 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism*. Acta Endocrinologica, 101, 15-24.
- 16) Robert F., Hardy J. (1975). *Prolattin-secreting Adenomas*. Arch. Path. Lab. Med 99, 625-633.
- 17) Scheithauer B.W. (1988). *Monoclonal antibodies in diagnostic Immunohistochemistry*. Siegal Eds, Dekker Inc., NewYork, Basel, 413-454.
- 18) Solcia E., Capella C., Buffa R., Frigerio B., Fontana B., Usellini L. (1977). *Tumori della Ipofisi: diagnosi morfologica e classificazione*. Pathologica 69, 333-346.
- 19) Zaki F.A., Liu S.K. (1973). *Pituitary chromophobe Adenoma in a cat*. Vet. Path. 10, 232-237.