

TUMORES DA HIPÓFISE:

**CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO CLÍNICO E MOLECULAR PARA O
CONHECIMENTO DA PATOGENIA E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO
DOS TUMORES CLINICAMENTE NÃO FUNCIONANTES**

Maria Leonor Viegas Gomes



Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra
Coimbra 2011

**TUMORES DA HIPÓFISE:
CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO CLÍNICO E MOLECULAR PARA O CONHECIMENTO
DA PATOGENIA E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS TUMORES
CLINICAMENTE NÃO FUNCIONANTES**

Maria Leonor Viegas Gomes

Tese submetida para candidatura a provas para grau em Doutor em Ciências da Saúde, no ramo de Medicina, na Especialidade de Medicina Interna/Endocrinologia, Doenças do Metabolismo e Nutrição, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.



**Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra
Coimbra 2011**

Grandes são os desertos, e tudo é deserto. (...)
Grandes são os desertos e as almas desertas e grandes
Desertas porque não passa por elas senão elas mesmas,
Grandes porque de ali se vê tudo, e tudo morreu. (...)
Não tirei bilhete para a vida,
Errei a porta do sentimento, (...)
Grandes são os desertos, e tudo é deserto.
Grande é a vida, e não vale a pena haver vida, (...)
Grandes são os desertos e tudo é deserto,
Salvo erro, naturalmente.
Pobre da alma humana com oásis só no deserto ao lado! (...)

Álvaro de Campos, in 'Poemas'
Heterónimo de Fernando Pessoa

Esta tese não foi escrita de acordo com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

**TUMORES DA HIPÓFISE: CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO CLÍNICO E MOLECULAR
PARA O CONHECIMENTO DA PATOGENIA E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS
TUMORES CLINICAMENTE NÃO FUNCIONANTES**

SUMÁRIO

A glândula hipofisária é um órgão vital que regula diversas funções de outras glândulas endócrinas e seus tecidos alvo, dispersos por todo o organismo. Virtualmente todos os órgãos ou tecidos são afectados, directa ou indirectamente, pelas hormonas segregadas pela hipófise anterior e posterior. A homeostasia hipofisária na sensação de bem-estar, desempenho físico, e qualidade de vida levou a um maior interesse e reconhecimento da disfunção hipofisária. Esta é comum, podendo apresentar-se de forma clara e evidente, levando facilmente ao diagnóstico etiológico de origem a partir da hipófise, até quadros clínicos subtis e não específicos, que muitas vezes tornam difícil o seu relacionamento com uma origem hipofisária. Tem havido um enorme progresso no conhecimento do desenvolvimento, fisiologia e patologia da hipófise. Esta nova informação trouxe um impacto significativo no reconhecimento e compreensão dos tumores da hipófise. Estes, embora pouco frequentes, podem condicionar importante morbidade e, eventualmente, mortalidade, não pela malignidade mas pela invasão local e síndromes endócrinas de hiperprodução ou hipoprodução hormonal. A biologia molecular melhorou em muito o conhecimento da patobiologia destes tumores, e a análise epidemiológica confirmou que há um aumento da sua incidência. Assim sendo, o conhecimento dos seus aspectos clínicos, patogénicos, do tratamento e do prognóstico revestem-se da maior importância para uma melhor compreensão e orientação. Os tumores clinicamente não funcionantes são um desafio a qualquer endocrinologista. A clínica por ser, com alguma frequência, muito subtil ou 'negligenciável', leva a um diagnóstico mais tardio com importantes repercussões a nível das estruturas locais e sistémicas, pelo hipopituitarismo condicionado pela lesão tumoral. As abordagens do tratamento são mais limitadas devido à inexistência de um tratamento médico eficaz. A previsibilidade do seu comportamento de progressão ou recorrência local ainda não tem sido possível. Apesar da evolução do conhecimento, de momento, continuam a não existir marcadores seguros clínicos, bioquímicos, radiológicos e moleculares do seu prognóstico.

Este trabalho pretendeu contribuir para um melhor conhecimento do comportamento biológico destes tumores, por revisão bibliográfica e investigação de aspectos clínicos e moleculares envolvidos na sua génese e evolução, de forma a permitir um tratamento e seguimento mais adequados dos doentes com esta patologia. Procedeu-se a uma análise clínica em 236 doentes com tumores da hipófise aparentemente esporádicos e clinicamente não funcionantes, 15 microadenomas e 221 macroadenomas. O estudo foi dirigido fundamentalmente aos macroadenomas tendo envolvido a sua apresentação clínica, o estudo hormonal da função hipofisária, o tratamento e as características dos tumores, cuja análise teve como objectivo *major* a identificação de factores clínicos com potencial valor preditivo para a progressão ou recorrência da doença. A análise molecular foi realizada em 235 doentes (com diferentes tipos de tumores da hipófise), e num grupo controlo (de 256 indivíduos saudáveis), tendo incluído o estudo dos genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1*, genes codificadores de enzimas metabolizadoras de genotóxicos; o gene *AIP*, envolvido na predisposição familiar para tumores da hipófise e também na metabolização

de genotóxicos, foi igualmente estudado em 20 doentes (com idade inferior a 35 anos), com somatotrofinomas ou mamossomatotrofinomas.

Os microadenomas clinicamente não funcionantes, após um seguimento médio de 6,6 anos (1 a 15 anos), não evidenciaram variações significativas nas suas dimensões pelo que perante este tipo de adenomas o prognóstico revelou-se bom e o tratamento conservador, o tratamento de eleição.

Os macroadenomas tiveram uma taxa de progressão ou recorrência de 41,2% após um seguimento médio de 8,7 anos (1 a 40 anos); o tempo médio de progressão ou recorrência foi de 3,9 anos. Os factores clínicos associados a um prognóstico de progressão ou recorrência, definido pela necessidade de uma segunda intervenção terapêutica, foram a dimensão e invasão dos tumores, nomeadamente um valor de corte para o maior diâmetro superior a 20 mm, a invasão do seio cavernoso, do pavimento ou óssea, e a remoção cirúrgica aparentemente completa aquando da primeira cirurgia. Estiveram associados a uma menor progressão ou recorrência dos tumores a ocorrência de apoplexia e a realização de radioterapia de consolidação. De todos estes factores o mais determinante foi a radioterapia coadjuvante mas não foi passível de uma análise segura devido ao pequeno número de doentes irradiados; os seguintes factores mais importantes foram as dimensões do maior diâmetro do tumor e a sua remoção aparentemente total, na primeira cirurgia.

A susceptibilidade a factores externos, conferida por polimorfismos nos genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1* não se revelou relevante, uma vez que não foram documentadas diferenças significativas entre os doentes e o grupo controlo, à excepção de uma frequência alélica superior para o alelo metabolizador activo (*CYP2D6*1*) do gene *CYP2D6* no grupo dos doentes. Contudo o seu significado é incerto e requer estudos adicionais. O gene *AIP* não se mostrou envolvido nesta amostra uma vez que não foi detectada nenhuma mutação germinal em 20 doentes jovens e com somatotrofinomas ou mamossomatotrofinomas, doentes aparentemente com maior risco para mutações germinais neste gene.

Poder-se-á assim admitir que, neste estudo, a dimensão dos tumores, particularmente quando superior a 20 mm, e uma primeira remoção cirúrgica aparentemente total são, de momento, os marcadores clínicos mais relevantes na predição do prognóstico de progressão ou de recorrência dos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes e que o estudo molecular, de genes envolvidos no metabolismo de genotóxicos e em síndromes familiares, não permitiu encontrar factores de predisposição nem marcadores do comportamento biológico nos diferentes tipos de tumores aparentemente esporádicos da hipófise.

ABSTRACT

The pituitary gland regulates many functions of other endocrine glands and their target tissues throughout the body. Virtually every organ or tissue is affected, directly or indirectly, by the hormones secreted by the anterior and posterior pituitary. The pituitary homeostasis in emotional wellbeing, physical performance, and quality of life has reached public attention and has led to increasing recognition of pituitary dysfunction. Pituitary dysfunction is common; however, the manifestations of pituitary disease vary from florid clinical features that can be readily identified and recognized as pituitary in etiology to more subtle and nonspecific problems that are often overlooked or misdiagnosed, leaving the relationship to pituitary malfunction unnoticed. There has been significant progress in understanding of pituitary development, physiology, and pathology. This new information has impacted on the recognition and understanding of pituitary tumors. These, even rare, can condition important morbidity and, eventually, mortality, not for the malignancy but for the local invasiveness or endocrine syndromes of hormonal hyperproduction or hypoproduction. Molecular biology has improved our understanding of the pathobiology of pituitary tumors, and epidemiologic analysis has confirmed that there is an increasing incidence of pituitary tumors. Thus, the knowledge of its clinical, pathogenic, treatment and prognostic factors is very important for the understanding and management of these tumors. Nonfunctioning pituitary tumors are a challenge to any endocrinologist. Because of its clinical presentation can be so subtle or 'neglected', the diagnosis may be delayed, with local and systemic important repercussions. Treatment approach is limited due to the inexistence of an efficient medical treatment. The previsibility of its behavior of local invasion or recurrence has not been possible still now. Although the increase knowledge of evolution, at the moment, there is no clinical, biochemical, radiological or molecular markers of its prognostic.

In this way a revision was performed as well as an investigation of clinical and molecular factors that can be involved in these tumors, in order to contribute for a better understanding of its biological behavior (particularly progression or recurrence of the disease) and treatment of patients with this pathology.

It was performed a clinical study in 236 patients with apparently sporadic nonfunctioning pituitary tumors, 15 microadenomas and 221 macroadenomas. The main tumors considered were the macroadenomas, and the study involved the clinical presentation, the pituitary function, the treatment and the characteristics of the tumors. Molecular analysis was performed in 235 patients (with different types of pituitary tumors) and in a control group (of 256 healthy people) that included the study of polymorphisms on *CYP2D6*, *GSTM1* and *GSTT1*, genes coding for metabolizing genotoxic enzymes; the *AIP* gene, involved in familial predisposition to pituitary tumors and also in xenobiotic enzymes, was also studied in 20 patients (younger than 35 years), with somatotrophinomas or mamosomatotrophinomas.

Clinically nonfunctioning microadenomas, after a mean follow up of 6.6 years (1-15 years), didn't show significant variations in its size so for this type of tumors the prognosis was good and conservative treatment was the treatment of choice.

The rate of progression or recurrence of macroadenomas was 41.2% after a mean follow up of 8.7 years (1-40 years); the average time of progression or recurrence was of 3.9 years. The most important clinical factors associated with a prognosis of progression or recurrence, defined by the need for a second therapeutic intervention, were the size and invasion of tumors, including a cutoff point for the larger diameter of 20 mm, the invasion of the cavernous sinus and of the floor or the bone of the sella, and apparently complete surgical removal during the first surgery. The occurrence of apoplexy and radiotherapy were associated with lower progression or recurrence of tumors. Of all these factors the most decisive was the adjuvant radiotherapy but was not capable of a reliable analysis due to the small number of patients irradiated; the following more important factors were dimensions of the larger diameter of the tumor and its apparently total removal, in the first surgery.

The susceptibility conferred by the polymorphisms on *CYP2D6*, *GSTM1* and *GSTT1* genes was not significant since no differences were documented between patients and the control group, except for a higher frequency for the active metabolizer allele (*CYP2D6*1*) of the *CYP2D6* gene in patients. However, its meaning is uncertain and requires further studies. The *AIP* gene was not involved in this sample since no germline mutation was detected in 20 young patients with somatotrophinomas or mammosomatotrophinomas, patients with apparently higher risk for germline mutations in this gene.

It might be well to admit that, in this sample, the size of tumors, particularly when greater than 20 mm, and an effective first surgery are, at present, the most relevant clinical markers in prediction of prognosis of clinically nonfunctioning pituitary tumors and that the study of the genes coding for metabolizing genotoxic enzymes or involved on familial syndromes failed to find molecular factors of predisposition or biological behavior of apparently sporadic pituitary tumors.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho consistiu num projecto conjunto pelo que não poderia apresentá-lo sem antes expressar o meu profundo e reconhecido agradecimento a todos os envolvidos, pelo seu afecto, dedicação, generosidade, conhecimento e tempo dispendido. Bem-haja a todos.

À minha Orientadora, Directora do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE - Unidade Curricular de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Professora Doutora Manuela Carvalheiro, que me tem guiado e impulsionado desde a minha formação pré-graduada até hoje, a minha sincera gratidão não só pelo acompanhamento profissional mas também e sobretudo pela disponibilidade que sempre dispensou em permitir que este projecto fosse uma realidade e pelo seu entusiasmo e perseverança para que tal acontecesse. Finalmente não poderia deixar de mencionar uma palavra sobre o seu carácter humano e carinho que sempre me dispensou.

Ao meu Mestre, Dr. Manuel Martins Almeida Ruas, então Director do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, durante a minha formação como Interna de Endocrinologia e nos anos seguintes como Especialista, agradeço o exemplo de uma singular qualidade científica, de rigor, de pioneirismo e de uma particular e especial amizade. Sem o seu entusiasmo e impulso este projecto não se teria iniciado. Realço que os trabalhos desenvolvidos para este projecto foram ainda iniciados e impulsionados enquanto Director do Serviço.

Aos meus Colegas do Serviço, quer os ainda actualmente no Serviço quer os que por diferentes motivos já não o integram, um reconhecimento muito especial por todo o apoio humano e científico, entusiasmo e tempo dispendido. Sem a sua incondicional ajuda e presença este percurso teria sido bem mais difícil ou mesmo impossível, árido e sem sentido. Não posso deixar de mencionar, em particular, a Dra. Isabel Paiva, uma referência nesta área da Endocrinologia, pela partilha de conhecimentos e pelo seu cuidado, rigor, carinho e disponibilidade de tempo pessoal dispendidos na revisão desta tese, que muito contribuíram para o seu aperfeiçoamento. Um bem-haja para todos vós.

A todos os outros elementos do Serviço (Nutricionistas, Srs. Enfermeiros, Sras. Assistentes Técnicas, Sras. Assistentes Operacionais) devo igualmente um carinho, apoio e boa vontade inexcedíveis a que dificilmente poderei retribuir.

Ao Professor Doutor Fernando Regateiro e à Professora Doutora Henriqueta Breda uma gratidão muito especial por me terem permitido iniciar os trabalhos moleculares no

Serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e pelo seu apoio sempre presente e incondicional.

À Professora Doutora Manuela Lacerda, Directora do Serviço de Anatomia Patológica, e à Professora Doutora Teresa Martins, Responsável do Laboratório de Patologia Molecular, do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil do Centro Regional de Oncologia de Coimbra, EPE, um reconhecimento e gratidão sinceros por terem permitido a continuação do trabalho de investigação molecular e pela simpatia e acolhimento carinhoso com que sempre me receberam. Destaco ainda o trabalho e tempo dispendido, sempre com boa vontade, pela Professora Doutora Manuela Lacerda na revisão das lâminas.

O trabalho molecular só foi possível por ter sido guiado e apoiado por dois Colegas e Amigos que muito considero e admiro, o Professor Doutor Manuel Lemos e o Professor Doutor Hugo Prazeres. Ao primeiro devo o impulso (a chave) e concretização inicial do estudo molecular deste projecto. Sem o seu incentivo, apoio, conhecimento e 'inquietação' científicos, acolhimento logístico laboratorial e amizade esse trabalho não se teria iniciado. Ao Professor Doutor Hugo Prazeres, que tornou possível a continuação do estudo molecular, uma profunda gratidão pelo seu carinho, empenhamento e entusiasmo despojados, rigor e qualidades científicas que dificilmente se encontram ao longo da nossa vida profissional. Obrigada Lemos, obrigada Hugo.

À Dra. Olinda Rebelo, Anátomo-Patologista do Laboratório de Neuropatologia do Serviço de Neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE, uma palavra de grande gratidão pela sua sempre boa vontade e empenhamento. Sublinho que apesar dos poucos recursos humanos que dispõe sempre se mostrou disponível e pronta para colaborar neste projecto. Uma palavra ainda de agradecimento para as Técnicas Superiores que igualmente sempre se mostraram amavelmente disponíveis desempenhando com grande zelo o apoio que lhe foi solicitado.

Aos Neurocirurgiões, nomeadamente aos Drs. Fernando Gomes, Manuel Rito e Francisco Belo, gostaria de sublinhar a sua excelente relação profissional, dedicação e encorajamento para que esta área da Neuroendocrinologia fosse sempre melhor e pelo seu imprescindível contributo no desenvolvimento deste trabalho. Trabalhar com eles foi e é um privilégio o que muito contribui não só para o desenvolvimento desta área como também para uma melhor assistência às pessoas com patologia deste foro.

À Dra. Margarida Marques, Engenheira Informática dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE e do Instituto Biomédico de Investigação, da Luz e Imagem, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, o meu sincero e reconhecido agradecimento pela sua inextinguível boa vontade, profissionalismo e entusiasmo que dedicou ao trabalho conjunto da análise estatística dos resultados obtidos e que só assim tornou possível a sua apresentação e obtenção de conclusões.

Ao Professor Doutor Ashley Grossman e à Professora Doutora Marta Korbonits devo uma disponibilidade total e um apoio incondicional nos trabalhos e ideias desenvolvidas em parte da área molecular deste projecto. Sem a sua contribuição este trabalho teria ficado mais pobre.

Gostaria ainda de mencionar o papel de outros Colegas com que me fui e tenho cruzado que pelo seu conhecimento, afecto e palavras me foram tocando, o que contribuiu igualmente para a concretização deste projecto.

Devo ainda um agradecimento muito especial aos Doentes pelo seu carinho, dedicação, compreensão e palavras de encorajamento e sem os quais este trabalho não teria sido possível nem teria feito sentido.

Os Amigos são o suporte insubstituível de qualquer projecto de vida. Um agradecimento personalizado, embora merecido, seria longo e inevitavelmente incompleto. Até os poderia nomear mas bem sei que eles se reconhecem e sabem exactamente qual o papel que têm ocupado. Sem a sua presença tudo seria quase no limite do insuportável. Foram e são eles que me obrigam a continuar. Para todos vós não há palavras, talvez um silêncio.

À minha Família devo o calor humano, paciência, horas de privação e mesmo sofrimento. Ao meu Pai, meu mentor de conduta humana, gostaria de deixar aquela palavra nunca verbalizada de como tenho orgulho na sua honestidade, desempenho profissional e qualidades humanas. Pelo seu exemplo não tem sido fácil ser sua filha mas é um privilégio e orgulho dos quais jamais abdicaria. Se pudesse 'oferecer' todas as horas de dedicação a que este projecto me obrigou seria a ele pois foi o que mais sofreu e que certamente mais orgulho tem na sua concretização. À minha Mãe, minha mentora espiritual, que veio para me proteger e iluminar devo o mais difícil, o impossível, aquele amor incondicional que está presente mesmo quando injustiçado. Sem a sua alegria, espiritualidade, amor e coragem não teria tido a capacidade de continuar. Ao meu Irmão devo aquela segurança e carinho silenciosos essenciais para que neste percurso não tenha a sensação triste de um ser órfão. À Cristina devo a compreensão e aceitação das vicissitudes de uma família que não é a originalmente nossa. Aos meus Sobrinhos poderia deixar uma palavra de gratidão pelo seu amor, juventude, inovação e alegria tão necessários quando tudo já nos parece monótono e algo sem sentido. Não pretendo ser um exemplo porque eles bem sabem que a finalidade última da vida é encontrar a forma pessoal de se ser feliz. Esta, sim, seria a mensagem que lhes dedico e que gostaria que retivessem.

Finalmente um agradecimento a Todos os que por algum motivo não mencionei e que igualmente me têm acompanhado e aos Mestres que me suportaram nos momentos menos felizes.

E, claro, a Ti, como sempre...

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ACTH	adrenocorticotrophic hormone
ADN	ácido desoxirribonucleico
AGRP	agouti-related peptide
AHR	aryl hydrocarbon receptor
AIP	aryl hydrocarbon receptor interacting protein
AKT	phosphatidylinositol kinase/protein kinase B
AMPC	cyclic adenosine monophosphate
APUD	amine precursor uptake and decarboxilation
ATP	adenosine triphosphate
BAG1	Bcl-associated athanogene
BMP-4	bone morphogenetic protein-4
BstN1	enzima de restrição metilase do bacillus stearothermophilus
cADN	ácido desoxirribonucleico complementar
CART	cocaine- and amphetamine-related transcript
CCND1	cell cycle nuclear D1 gene
CDK	cyclin dependent kinase
CDKI	cyclin dependent kinase inhibitor
CLIP	corticotropin-like intermediate lobe peptide
CpG	cytosine-phosphate-guanine
CREB	cAMP response element-binding protein
CRH	corticotrophin releasing hormone
CUTE	corticotroph upstream transcription element
CYP2D6	cytochrome P450 2D6
DAP kinase	death-associated protein kinase
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	deoxynucleoside triphosphates
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	estrogen receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESPL1	extra spindle poles-like 1 protein
FGF-2	fibroblast growth factor-2
FGF-4	fibroblast growth factor-4
FIHP	familial isolated primary hyperparathyroidism
FIPA	familial isolated pituitary adenoma
GABA	γ -aminobutyric acid

GADD45G	growth arrest and DNA damage-inducible protein gamma
GATA	família de factores de transcrição, que contém em seu domínio de ligação ao ADN duas sequências <i>zinc fingers</i> e que se ligam à sequência (A/T)GATA(A/G)
GDT	guanosine diphosphate
GH	growth hormone
GHRH	growth hormone releasing hormone
GHS	growth hormone secretagogue
GNAS1	guanine nucleotide-binding protein, alpha-stimulating activity polypeptide-1
CpG	cytosine preceding guanine
GPCR	G protein-coupled receptor
GSTT1	glutathione S-transferase theta-1
GSTM1	glutathione S-transferase μ -1
GTP	guanosine 5'-triphosphate
HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1 α
HPT	hyperparathyroidism
HPT-JT	hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome
ICMA	immunochemiluminescent assay
IFA	immunofluorescence assay
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IRMA	immunoradiometric assay
JAK 2	Janus cinase 2
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
Kb	kilobases
Lhx	a group of LIM homeobox genes
LIF	leukaemia inhibitory factor
LOH	loss of heterozygosity
MAGE	melanoma-associated antigen
MAPK	mitogen-activated phosphor- kinase
MAP2K	MAPK kinase
MAP3K/MAPKK	MAPK kinase kinase
MEG	maternally expressed gene
MEG3A	maternally expressed protein 3A
MEN1	multiple endocrine neoplasia type 1
MEN2	multiple endocrine neoplasia type 2
MGMT	O-6 metil-guanin-DNA metil transferase
mTOR	mammalian target of rapamycin
Nm	nano micra
NY	neuroptide Y
NYY	neuroptide YY
PAP	pituitary adenoma predisposition
PAS	periodic acid Schiff
PCR	polymerase chain reaction

PI3K	phosphoinositide 3-kinase
Pit-1	pituitary transcription factor-1
PKA	protein kinase-A, cAMP-dependent protein kinase
PKC	protein kinase-C
PM	poor metabolizer
POMC	proopiomelanocortin
POU	family three mammalian transcription factors, PIT1 and OCT1 (Octamer transcription factor) (MIM 164175) of mammals, and neural Unc-86 of <i>Caenorhabditis elegans</i>
PPAR	peroxisome proliferator activating receptor
PRKAR1	protein kinase-A regulatory subunit 1
PRKAR1A	protein kinase-A regulatory subunit 1 α
PRL	prolactin
Prop-1	prophet of Pit-1
PTAG	pituitary tumor apoptosis gene
PTP	phosphotyrosine phosphatase
PTTG	pituitary tumour transforming gene
Ptx1	<i>bicoid</i> -related pituitary homeobox factor
Ptx2	pituitary homeobox factor 2
RAR	retinoic acid receptor
RB	retinoblastoma gene
RIA	radioimmunoassay
RM	ressonância magnética
ROC	receiver operator characteristic
Rpx	Rathke's pouch homeobox protein
RTK	receptor tyrosine kinase
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
SF-1	steroidogenic factor-1
SH2-PK	src-related protein kinases
SFRP1	secreted frizzled related protein 1
SPSS	statistical package for the social sciences
SRIF/SS	somatotropin release inhibitory factor / somatostatin
SSA	somatostatin analogues
SST/SSTR	somatostatin receptor
STAT	signal transducer and activator of transcription proteins
SUMO	small ubiquitin-like modifier
Taq	thermos aquaticus
Tbx19	T box factor, T-pit
TC	tomografia axial computadorizada
TEF	thyrotroph embryonic factor
TGF- α	transforming growth factor-alfa
TGF- β	transforming growth factor-beta
TLE2	transducin-like enhancer of split 2

TRH	thyrotropin-releasing hormone
TSG	tumor suppressor gene
TSH	thyrotrophic hormone
VEGF	vascular endothelial-derived growth factor
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
WT	wild type
ZAC	zinc-finger protein pleiomorphic adenoma gene-like 1

ÍNDICE

Págs.:

SUMÁRIO	i
ABSTRACT	iii
AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	ix
ÍNDICE	xiii
PREFÁCIO	xvii
I. INTRODUÇÃO	1
1. Neuroendocrinologia	3
1.1. Introdução	3
1.2. Breve introdução histórica	5
1.3. Anatomia e embriologia	17
1.4. Desenvolvimento, histologia e fisiologia normal do eixo hipotálamo-hipofisário...20	
2. Tumores da hipófise: nota introdutória	35
2.1. Conceito e epidemiologia	35
2.2. Classificação.....	37
2.3. Fisiopatologia: mecanismos moleculares e tróficos de indução da formação tumoral	40
3. Tumores da hipófise clinicamente não funcionantes	77
3.1. Conceito e epidemiologia	77
3.2. Classificação e histopatologia.....	77
3.3. Clínica.....	80
3.4. Diagnóstico	83
3.5. Tratamento	85
3.6. Efeitos a longo prazo	98
3.7. Estratégia global de tratamento e seguimento.....	99
3.8. Prognóstico.....	100
3.9. Conclusão	101
II. OBJECTIVOS	103
1. Objectivos principais	105
2. Objectivo adicional	105

III. MATERIAL E MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO	107
1. Instituições envolvidas	109
2. Populações	110
2.1. Doentes.....	110
2.1.1. Amostra para o estudo clínico.....	110
2.1.2. Amostra para o estudo molecular dos genes <i>CYP2D6</i> , <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	111
2.1.3. Amostra para estudo molecular do gene <i>AIP</i>	111
2.2. População de controlo.....	111
3. Métodos de investigação e desenho dos estudos	111
3.1. Estudo clínico	111
3.1.1. História clínica	112
3.1.2. Avaliação bioquímica e hormonal	112
3.1.3. Estudo neurorradiológico	113
3.1.4. Tratamento	114
3.1.5. Estudo neuropatológico	115
3.1.6. Evolução.....	116
3.1.7. Progressão ou recorrência do tumor	116
3.2. Estudo molecular	117
3.2.1. ADN germinal.....	117
3.2.2. Estudo dos genes <i>CYP2D6</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i>	117
3.2.3. Estudo do gene <i>AIP</i>	119
3.2.4. Problemas éticos	119
3.3. Estudo estatístico	120
3.3.1. Estudo clínico.....	120
3.3.2. Estudo molecular	120
IV. RESULTADOS	121
1. Estudo clínico	123
1.1. Amostra global.....	123
1.2. Microadenomas clinicamente não funcionantes	125
1.3. Macroadenomas clinicamente não funcionantes	125
1.4. Macroadenomas clinicamente não funcionantes: progressão ou recorrência e factores preditivos.....	137

2. Estudo molecular	155
2.1. Genes <i>CYP2D6</i> , <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	155
2.2. Gene <i>AIP</i>	156
V. DISCUSSÃO	159
1. Estudo clínico	161
1.1. Amostra global.....	161
1.2. Microadenomas clinicamente não funcionantes	162
1.3. Macroadenomas clinicamente não funcionantes	162
1.4. Macroadenomas clinicamente não funcionantes: progressão ou recorrência e factores preditivos.....	167
2. Estudo molecular	169
2.1. Genes <i>CYP2D6</i> , <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	170
2.2. Gene <i>AIP</i>	170
VI. CONCLUSÕES	173
1. Estudo clínico	175
2. Estudo molecular	176
3. Correlação dos estudos clínico e molecular	177
VII. RELEVÂNCIA DO TRABALHO REALIZADO	179
VII. BIBLIOGRAFIA	183

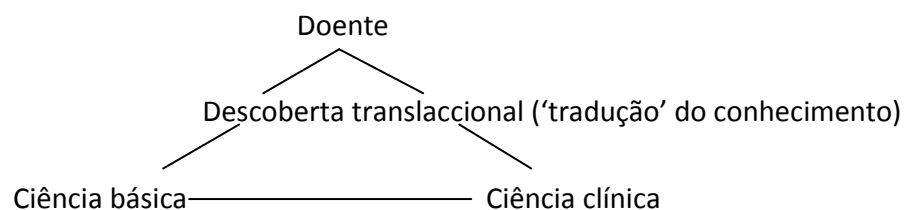
PREFÁCIO

A concretização deste trabalho inseriu-se numa vontade colectiva e numa missão pessoal em terminar algo que foi inicialmente tido como mais um aperfeiçoamento em uma área de conhecimento e actividade científica e assistencial para a qual tenho estado particularmente vocacionada e pela qual nutro um especial carinho. Reconheço que fiquei intelectualmente mais capaz podendo assim, eventualmente, tratar e acompanhar melhor todos aqueles que sofram da patologia aqui desenvolvida.

Embora o caminho pessoal esteja dependente do próprio, o privilégio de estar integrada em um Serviço de Endocrinologia de um Hospital Central e ligado à carreira Universitária e ser Assistente Convidada da Unidade Curricular de Endocrinologia, ambos diferenciados e com profissionais altamente motivados e briosos no desempenho das suas funções deu-me alento, apoio humano e científico para que tal acontecesse. Devo referir que a diferenciação de áreas da Endocrinologia e a sua agregação em consulta própria me permitiram tomar contacto com um vasto número de doentes com uma patologia pouco frequente, os tumores da hipófise. Em 1996 passei a ser responsável pela consulta de Tumores da Hipófise II, onde são seguidos os doentes com tumores da hipófise clinicamente não funcionantes, prolactinomas e tumores para-selares, o que me veio permitir adquirir experiência e diferenciação nesta patologia da Endocrinologia. Por outro lado, a evolução do conhecimento científico permitiu o surgimento de uma nova e importante área do conhecimento, a biologia molecular e genética médica. A Endocrinologia é uma das especialidades médicas que pela sua proximidade muito tem beneficiado com a sua evolução. Tive o privilégio de poder contactar fisicamente, desde muito cedo, com as técnicas inerentes a este sector do saber, quer pelas condições de pioneirismo que o Serviço ao qual pertenço tem, quer pela qualidade científica das pessoas que aí trabalham ou trabalharam. Foi assim que em 1999 passei a frequentar, de forma voluntária, o Laboratório de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra o que veio a permitir a realização de parte deste trabalho. Actualmente, a ciência básica (biologia molecular e genética médica), é uma área muito vasta e quase que 'inacessível' ao clínico cuja vida profissional se dirige preferencialmente à actividade assistencial. No entanto, aquele facto foi mais um motivo que me levou, então, a tentar aplicar alguns conhecimentos na patologia hipofisária, à qual, como já mencionado, me dedico em particular.

Os enormes progressos no avanço da tradicionalmente denominada de ciência básica, nos últimos 50 anos, não têm sido totalmente acompanhados de um impacto equivalente na prática clínica. No entanto seria impensável não investir nessa pesquisa uma vez que, sem novas descobertas, não há o que transferir para aplicação clínica. É tempo de dar uma ênfase especial para acelerar a aplicação do que se conhece em benefício dos doentes e mais importante ainda da preservação da saúde, criando assim um novo paradigma na pesquisa médica chamado '*bench to bed*' (da bancada à clínica) ou medicina translacional, e que se tem igualmente aplicado à Endocrinologia (endocrinologia translacional). Os

debates e as publicações sobre a medicina translaccional vêm crescendo de importância nos últimos anos. Há inclusive sectores da área biomédica a utilizar a nova nomenclatura, que ocupa parte das revistas da área ou mesmo levou à criação de novas revistas para publicação de seus artigos, como por exemplo a *Translational Research in Endocrinology & Metabolism*, uma antologia dos artigos de investigação translaccional das revistas da Sociedade de Endocrinologia Americana: *Endocrinology*; *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; *Molecular Endocrinology*. Este conceito foi, igualmente, ampliado: não se trata só de agilizar a transferência dos resultados da pesquisa de laboratório para aplicação em prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças, mas também de programar pesquisas de laboratório para avançar conhecimentos inspiradas em problemas clínicos não solucionados (da bancada à clínica e da clínica à bancada). A nova visão proposta pela medicina translaccional pode representar um importante papel, especialmente se forem criadas equipas multidisciplinares de pesquisa. No entanto é de salientar que a ‘translaccão’ não é mais do que uma ‘tradução’ do que se passa em ambos os conhecimentos, básico e clínico. Por conseguinte a evolução do conhecimento humano para decifrar a origem dos seus enigmas de observação criou esta nova necessidade. O conceito não será novo mas a necessidade sim e motivada, certamente, pela complexidade crescente da ciência básica e do aperfeiçoamento e expansão da ciência clínica. Assim sendo, tornou-se imprescindível essa translaccão ou tradução para a noção global do conhecimento.



Reconheço que o trabalho desenvolvido, embora de uma forma não totalmente consciente, veio ao encontro dos primórdios do que é hoje considerado o mais actual e de maior relevância no desenvolvimento do conhecimento, o desafio translaccional. Mas, como já referido, tal só é possível no contexto de um trabalho multidisciplinar em que o clínico devidamente preparado interage com áreas da ciência básica igualmente diferenciadas, de forma a melhorar o entendimento e qualidade de assistência aos doentes, ou melhor: preservar a saúde e o bem-estar do ser humano, objectivo último e *major* que considero ser a actividade profissional de um médico.

I. INTRODUÇÃO

1. Neuroendocrinologia

1.1. Introdução

As doenças endócrinas da área hipotálamo-hipofisária foram, durante anos, consideradas como intelectualmente desafiadoras, fisiologicamente fascinantes mas... um pouco esotéricas.¹ Inicialmente muitos endocrinologistas, particularmente os dedicados à endocrinologia geral, poderiam passar anos sem encontrar, por exemplo, uma acromegalia. Hoje em dia a realidade é distinta estimando-se que os tumores da hipófise clinicamente relevantes tenham uma prevalência de cerca de 1:1.000, o que representa um valor de 3,5 a 5 vezes superior ao anteriormente considerado.² Assim sendo, as doenças da hipófise já não podem e não devem ser consideradas como doenças muito particulares e raras, mas sim como um problema médico relevante e de importante impacto. Neste sentido, sempre foi um desafio gratificante tentar perceber melhor a neuroendocrinologia e nomeadamente os tumores da hipófise, com o objectivo não só de aperfeiçoar o conhecimento e curiosidade científica como também, e sobretudo, cuidar melhor das pessoas com este tipo de patologia.

A endocrinologia é uma ciência em expansão para a qual novos conhecimentos e conceitos surgem quase que diariamente na literatura médica. O sistema endócrino e o sistema nervoso são os principais reguladores de informação entre as diversas células, tecidos e órgãos. O termo 'endócrino' denota secreção interna de substâncias com actividade biológica.³ No entanto o conceito clássico de endocrinologia, de glândula endócrina, de hormona que se liga a moléculas receptoras específicas que, por sua vez, regulam a função do tecido alvo, tem-se alterado e alargado de forma extraordinária nos últimos anos. Os receptores podem-se localizar a nível da membrana celular ou a nível do núcleo, tendo propriedades bifuncionais de reconhecimento e activação do sinal. Hoje em dia vários órgãos são verdadeiras glândulas endócrinas (são exemplo o cérebro, o endotélio, o epitélio do aparelho digestivo, o osso, o tecido adiposo, etc.) e qualquer substância poder-se-á comportar como uma hormona (são exemplo citocinas, neurotransmissores, etc.) podendo estas 'hormonas' actuar intracelularmente (acção 'intracrina' e 'autocrina'), célula com célula vizinha (acção 'paracrina' e 'justacrina') ou à distância (acção 'endocrina'). O desenvolvimento da genética médica teve um contributo enorme e essencial ao melhor conhecimento deste capítulo da ciência. Abordagens de maior âmbito como a genómica (maior ênfase sobre o genoma), a proteómica (maior ênfase sobre os padrões de expressão do genoma) e mais recentemente sobre a epigenética ou epigenómica [maior ênfase sobre o que está para além do genoma (epigenoma), que o pode modificar e que embora não fazendo parte do ADN pode ser transmitido de célula para célula e através de gerações] são essenciais à compreensão dos fenómenos biológicos básicos. O impacto da biologia molecular, da tecnologia de ADN recombinante e da sequenciação do genoma humano, bem como do que está para além do genoma, sobre a endocrinologia reflecte-se no melhor conhecimento da fisiologia e fisiopatologia, no diagnóstico e no tratamento das doenças endócrinas.

A neuroendocrinologia é a área da endocrinologia que diz respeito às interações entre os sistemas nervoso e endócrino. As ações de ambos os sistemas e as suas interações estão subjacentes a praticamente todos os mecanismos reguladores do organismo humano. O eixo hipotálamo-hipofisário constitui a principal interface neuroendócrina primária formando uma unidade que controla várias glândulas periféricas e outras actividades fisiológicas. O hipotálamo contém vários núcleos de células neuronais; estabelece comunicação com outras regiões do cérebro e regula muitas das suas funções, nomeadamente a temperatura, o apetite, a sede, o comportamento sexual, as reacções de defesa e os ritmos corporais. Entretanto, é também um órgão endócrino, libertando neurohormonas específicas para a hipófise posterior e anterior e produzindo neurotransmissores como aminas [dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina, acetilcolina, ácido amino- γ -butírico (GABA) e histamina], neuropeptídeos [peptídeo vaso-intestinal (VIP), substância P, neurotensina, componentes do sistema renina-angiotensina, colecistocinina, peptídeos opióides, peptídeo natriurético auricular e peptídeos relacionados, galanina, endotelina e neuropeptídeo Y] e aminoácidos (glutamato e glicina) bioactivos; alguns destes neurotransmissores afectam também a hipófise anterior.

A secreção das hormonas da hipófise anterior obedece fundamentalmente a três padrões: (a) ritmos cerebrais espontâneos que promovem a secreção hormonal hipofisária e hipotalâmica pulsátil, sendo que a amplitude e a frequência dos pulsos estão dependentes de aferências provenientes do sistema nervoso central e de propriedades intrínsecas das células ou de ritmos circadianos (periodicidade aproximada de 24 horas) influenciados pelo ciclo de sono e vigília; (b) as hormonas periféricas que regulam a secreção das hormonas hipofisárias por mecanismos de retrocontrolo (maioritariamente negativos, embora podendo ser também positivos) exercidos a nível hipofisário, hipotalâmico e em ambos (de ansa curta ou de ansa longa), e mesmo ainda por mecanismos intra-hipofisários reguladores; (c) outros factores, que podem e intervêm na secreção das hormonas hipofisárias, como o stresse, o estado nutricional, doenças associadas e ainda outras hormonas. O efeito final de todos estes controlos de regulação é a eventual ritmicidade circadiana e secreção pulsátil já mencionadas, que levam à reprodução, crescimento e desenvolvimento normais, à homeostasia corporal global e às respostas ao stresse, críticas na adaptação às alterações face ao ambiente externo.

O sistema endócrino conjuntamente com os sistemas nervoso e imunitário serão então os responsáveis pela normal fisiologia do ser humano como ser físico. O conceito holístico do ser humano para além de físico, como ser psíquico e espiritual, ainda não é tão bem compreendido. Mesmo nesta área, a endocrinologia e neuroendocrinologia constituem possivelmente uma ponte importante com o seu sistema hipotálamo-hipofisário e a glândula pineal. A glândula hipofisária, ao constituir um coordenador vital do sistema endócrino e de aquela interface, torna-se assim de grande importância, uma vez que, qualquer patologia que a possa envolver levará a alterações importantes no ser humano.

Os tumores da hipófise condicionam uma grande variedade de doenças endócrinas. Um podem-se desenvolver e manifestar de forma rápida, como é o exemplo da amenorreia hiperprolactinémica, outras podem ter um desenvolvimento insidioso ao longo de anos, como acontece por vezes na acromegalia e na doença de Cushing e outras ainda podem

ser apenas descobertas incidentalmente, como alguns tumores clinicamente não funcionantes. Por outro lado, apesar de serem tumores histologicamente benignos, na sua quase totalidade, acarretam uma importante carga de efeitos clínicos, bem como de custos económicos directos, associados ao tratamento e seguimento, e indirectos associados à repercussão negativa no bem-estar e esperança de vida destes doentes. Assim sendo torna-se importante o conhecimento dos aspectos clínicos, de diagnóstico, de tratamento e de prognóstico destes tumores.

1.2. Breve introdução histórica

Neuroendocrinologia: um conceito milenar

É interessante reconhecer que o conceito de neuroendocrinologia e o conhecimento da fisiologia dos sistemas neuro-endócrino-imunitário modernos na regulação holística do ser humano, remontam a ideias ancestrais. *'[...] Metaphysical concepts and ideas may have helped, even in their early forms, to bring order into man's picture of the world, and in some cases they may even have led to successful predictions.'* Karl R. Popper, *The Logic of the Scientific Discovery, 1934/59.*⁴ O termo 'sistema neuroendócrino' foi usado de forma comum na literatura científica a partir de 1928-1940 após os trabalhos de E Scharrer e B Scharrer sobre as células neuro-secretoras do hipotálamo e de AGE Pearse entre 1966-1986, todas elas partilhando a capacidade de síntese e secreção de aminas e peptídeos, colectivamente designadas de sistema APUD (*amine precursor uptake and decarboxilation*)⁴ Baseado nestes conceitos, o sistema neuroendócrino compreendia órgãos isolados e células isoladas, todos capazes de produzir aminas hormonais (transmissores) e peptídeos hormonais (transmissores), bem como demonstrava a presença de marcadores de diferenciação neuronal, como a enolase específica dos neurónios e as cromograninas. Este conjunto de características definia o que se acreditava ser a função neuroendócrina.^{4,5} Consequentemente o termo de sistema neuroendócrino passou a ser um acrónimo da capacidade funcional comum a muitas células ou agregados celulares, independentemente da sua origem embrionária ou da identidade anatómica. Na verdade, actualmente presume-se que qualquer célula ou tecido tem a capacidade, quer no estado basal quer após estímulos ambientais, de diferenciar parte da sua modalidade de comunicação para uma função neuroendócrina. Esta propriedade, aparentemente ubiquitária, pode ser explicada pela existência de células estaminais indiferenciadas com fenótipos de diferenciação multidireccional.⁶ A questão pertinente que se coloca é a de saber qual a utilidade fisiológica das células exibirem uma função neuroendócrina.^{7,8,9,10} O conceito de rede de 'secreções internas' vem esclarecer esta questão. Na tentativa de oferecer uma resposta, aceita-se o conceito moderno de sistema neuroendócrino como aquele cujas células residem em qualquer parte do corpo vertebrado e expressam propriedades funcionais atribuídas originalmente apenas aos neurónios do sistema nervoso central e às glândulas endócrinas clássicas. Como tal, o eixo hipotálamo-hipófise-órgãos alvo, o sistema nervoso autónomo e o sistema APUD, todos são considerados parte

do sistema neuroendócrino. Contudo, o facto de células em qualquer estrutura do corpo poderem expressar função neuroendócrina, sugere que um circuito funcional mais vasto, baseado nas 'secreções internas', está fisiologicamente programado para regular a sobrevivência e integridade corporal,¹¹ e não necessariamente relacionado com a origem embrionária do tipo de secreção. Um exemplo paradigmático é o das células do sistema imunitário, elementos de origem mesodérmica, capazes de produzir peptídeos, aminas e fatores de crescimento que por sua vez podem actuar como hormonas, neurotransmissores ou reguladores locais.¹² Estes mediadores primariamente relacionados com a imunidade, podem influenciar aspectos cognitivos e não cognitivos do comportamento, quer nos animais quer no ser humano.¹³ Assim, uma concepção mais vasta das secreções internas é considerada mais exacta do que o termo restritivo de sistema neuroendócrino, para descrever a realidade fisiológica das comunicações intra e intercelulares que regulam o ambiente corporal interno. O interessante é que tal interpretação tem uma longa tradição. Em 1891 CD Brown-Sequard e A D'Arsonval sugeriram uma ligação entre 'secreções internas' e manutenção da 'estado corporal normal'.¹⁴ De forma semelhante, em 1895 E Schafer concebeu as 'secreções internas' como uma propriedade de 'qualquer órgão do corpo'.¹⁵ Em 1948, GW Harris estabeleceu a continuidade morfo-funcional do eixo hipotálamo-hipófise-órgãos alvo,¹⁶ mas posteriormente foi necessário um longo período de tempo para desenvolver de novo o conceito de secreções internas difusas como reguladores do meio ambiente interno. Esta ideia foi retomada em 1978 com o conceito de 'paraneurónio' por T Fujita, que originalmente apenas incluía elementos de natureza epitelial.¹⁷ Mais recentemente, no início dos anos noventa do século XX, foi sentida uma necessidade inegável por JE Blalock, de uma ligação transversal entre o sistema nervoso central, o eixo hipotálamo-hipófise-órgão alvo e o sistema imunitário,¹⁸ e por B Halasz, de uma rede de sinais que relacionam os eixos endócrinos clássicos com a rede de informações de entrada ou saída do sistema nervoso autónomo e das secreções 'locais' parácrinas ou autócrinas.¹⁹

É fácil considerar que uma ideia 'de secreções internas' como canais de informação na regulação da integridade corporal, incluindo o desempenho mental, está de uma certa maneira conectada ao estado energético que assegura esta integridade. Consequentemente, poder-se-á encontrar alguma semelhança com formulações antigas do que é designado de 'energia vital' em muitos conceitos filosóficos. Ideias precoces no hinduísmo tradicional, no pensamento biomédico clássico grego, romano, islâmico, medieval e do renascimento, de facto, indicavam para uma rede de 'fluxos' com origem em órgãos ou em partes diferentes do organismo, para explicar a fonte dessa 'energia'. À luz do conhecimento moderno, esta rede envolve relações anatómicas e funcionais entre o sistema nervoso central, as glândulas endócrinas clássicas e os órgãos linfóides, semelhante ao circuito das 'secreções internas', como anteriormente definido e cujo propósito *major* é o de manter o equilíbrio homeostático e estabilidade do genoma.⁴

Dos 35.000 genes que foram codificados no genoma humano, cerca de 35% têm expressão a nível do sistema nervoso. O cérebro humano é uma das coisas mais extraordinária que existe no Universo, pelo menos no conhecido. Apesar de saber ainda muito pouco do seu funcionamento, muito se vai conhecendo. É constituído por cerca de 10^{12} neurónios; 10^{15}

sinapses; milhões de quilómetros de axónios e dendrites mergulhados em um parênquima de células glias. Estas desempenham várias funções, tanto como suporte físico dos neurónios como a síntese de mielina, a influência do sistema imunitário, e o equilíbrio homeostático através da regulação do sistema endócrino. À medida que continuam os estudos genéticos do genoma, outro ramo da genética, a epigenética, está-se a desenvolver para o estudo do epigenoma; o estudo dos mecanismos pelos quais agentes externos ao genoma modulam delicadamente o nível de expressão dos genes. Assim, o estudo das diferentes patologias, tem confirmado que o que está em causa no seu desencadeamento é o encontro do genoma com os agentes externos (químicos, físicos, culturais).

Conceito hindu: no conceito hindu a interacção entre o sistema nervoso central e as estruturas endócrinas pode ser reportado ao conceito tradicional Tantra Yoga, da medicina Ayur Védica do século XIV antes de Cristo.²⁰ A doutrina Yoga concebe o corpo humano com sete centros energéticos, designados em sânscrito de *chakras*, dispostos numa direcção crânio-caudal ao longo da coluna vertebral (ver figura seguinte).

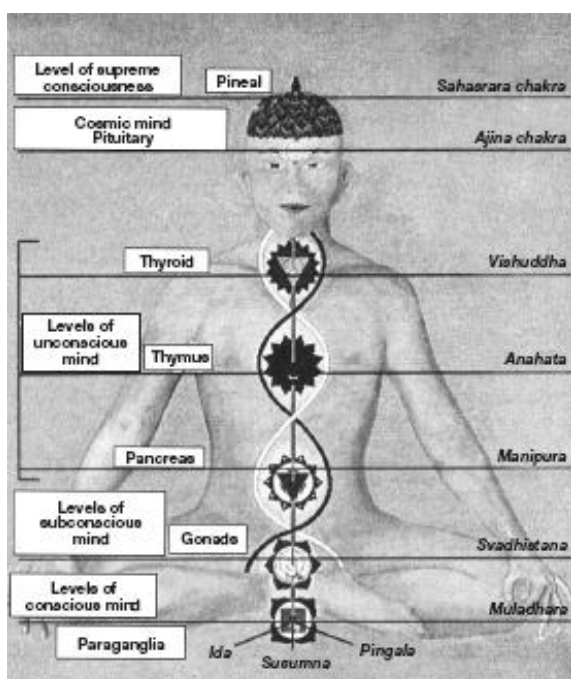


Figura de R Toni. *The neuroendocrine system: organization and homeostatic role.* J Endocrinol Invest (Suppl. to no. 6) 2004; 27: 35-47. Desenho esquemático mostrando a associação entre os sete 'vortex de energia' ou *chakras*, como o sugerido pela doutrina Hindu Yoga, e as estruturas do corpo humano com conhecida função neuroendócrina.

A localização desses 'vortex de energia' surpreendentemente coincide com sete estruturas endócrinas bem conhecidas. Especialmente cinco são glândulas endócrinas clássicas (pineal, hipófise, tiróide, pâncreas e gónadas), todas contendo células com as capacidades de função neuroendócrina,^{5,21,22,23,24,25} um é um órgão linfopitelial, o timo, com reconhecida actividade neuroendócrina,²⁶ e o outro corresponde à localização anatómica dos derivados da crista neuronal, os paragânglios coccígeos, que partilham com a medula adrenal e outros paragânglios, actividade neuroendócrina.⁵ Acredita-se que os *chakras* regulam as actividades visceromotora autónoma, voluntária somática, e de ideação, bem como o grau de consciencialização correspondente a cada resposta. O resultado final será

o de dar um sentido diferente ao *'self'* ou *'si mesmo'*, tradicionalmente definido como a mente inconsciente, subconsciente, consciente, cósmica e suprema.⁴ R Toni acredita que a relação entre os *chakras* e as estruturas endócrinas e autoimunes é puramente uma coincidência. Contudo, não deixa de referir que os conceitos metafísicos contêm uma relação muito estreita e inesperada com a evidência da fisiologia moderna do controlo neuroendócrino da homeostasia.⁴ Na perspectiva Tantra, de facto, a condutibilidade de uma informação nervosa de uma *'experiência'* (isto é, a actividade da medula espinhal) está ligada à resposta de diferentes centros *'energéticos'*. Em particular, acredita-se que os estímulos exteroceptivos (estímulos do exterior ou relativo a eles) e interoceptivos [sensibilidade às variações que se produzem no interior do corpo (sensibilidade profunda)] com origem na região perineal (localização do primeiro *chakra*) produzem um fluxo nervoso (representado tradicionalmente pelas duas serpentes *kundalini*) ao longo da medula espinhal (designados de canais de *susumna*), que modificam o limiar para uma resposta *'energética'* (isto é, torna os *'vortex de energia'* mais susceptíveis a produzir uma energia), de forma semelhante à acção dos transdutores neuroendócrinos actuais.²⁷ O objectivo último desta resposta seria a produção de uma consciência da existência e realidade pessoais. Incidentalmente (ou não), esta é a *'cadeia'* fisiológica que se espera que seja activada na prática Hata Yoga.⁴

Consequentemente, este conceito tão teórico fez pensar a alguns autores, nomeadamente a R Toni, que não deixa de ser uma antecipação filosófica da regulação da homeostasia tal como actualmente é conhecida. Prevê a existência de determinadas zonas corporais (isto é, a localização dos *chakras*) como pontos de conexão entre os estímulos externos e o balanço energético, e sugere uma modalidade de comunicação corpo-mente que evidencia afinidades com a interacção moderna da psico-neuro-endocrino-imunologia.^{4,13}

Conceitos gregos, romanos e islâmicos: no século VI antes de Cristo, Hipócrates descreveu nos seus *Aforismos*, o mecanismo que está na base do uso terapêutico para o reflexo neuroendócrino de libertação da prolactina. Ele referia que para terminar com evacuações excessivas das menstruações, dever-se-ia aplicar um copo grande de vidro no peito (Γυναικι τα καταμηνια ην βουλη επισχειν σικυην ως μεγιστην προς τυτθους προσβαλλε). O reflexo neuroendócrino da prolactina é bem conhecido e a inibição da lactação durante a amamentação está dependente deste mecanismo. Contudo, também manobras invasivas que induzam distensão vaginal ou rectal, como uma colposcopia ou colonoscopia, podem aumentar a prolactina.²⁸ Acredita-se que todos estes eventos levem a um reflexo neuroendócrino que reconhece, pelo menos nos modelos animais, uma activação de neurotransmissores específicos, de neurónios hipotalâmicos por estímulos interoceptivos.⁴ Recentemente, de forma semelhante, R Toni²⁹ também propôs que um determinado tipo de reflexo neuroendócrino explicaria a interpretação anedótica de antigos médicos romanos acerca do alargamento da região cervical nas mulheres virgens como um sinal precoce à primeira relação sexual, poeticamente designado por Latin Catullo (século I antes de Cristo), em uma das suas *Carmina*: *'Non illam nutrix orienti luce revisens hesterno collum poterit circumdare filo'* (ao alvorecer, a sua enfermeira não poderá enrolar a mesma linha em torno do pescoço da noiva que na noite anterior lá estava). O evento de

stresse ligado à desfloração, estará associado a um aumento transitório da glândula tiróide, que pode ser interpretado como uma consequência de vasodilatação simpática e aumento intraglandular do fluxo sanguíneo, idêntico ao aumento da tiróide durante uma crise hipertensiva na sequência de uma crise por um feocromocitoma.²⁹ Assim, quer a ‘sucção do peito’ da tradição Hipocrática quer a regulação da dimensão da tiróide pelo stresse na medicina Romana, podem ser consideradas como antecedentes históricos das interações neuroendócrinas entre o sistema nervoso autónomo e as glândulas endócrinas. R Toni, em ambos os contextos, o preceito Hipocrático e o conceito anedótico Romano, parece ver escondida uma relação com a fisiologia Yoga. Em uma perspectiva Tântrica, de facto, estes eventos implicam impulsos sensoriais da mama sob sucção (localizada ao nível do quarto *chakra*) ou da vagina (localizado ao nível do primeiro *chakra*) que são conduzidos por um canal de informação (a medula espinhal) até ao eixo hipotálamo-hipofisário ou glândula tiróide (ao nível do sexto e quinto *chakras*, respectivamente). Assim sendo interroga-se se a medicina Grega e Romana receberam uma herança da tradição biomédica Indiana. Não seria muito surpreendente uma vez que já Heródotos, contemporâneo de Hipócrates, mencionava na sua *História* algumas curiosidades médicas e hábitos indianos.^{4,20} Acredita-se que esta representação é a contraparte do símbolo Tântrico Indiano *nagakkal*.³⁰ A influência deste ícone, notavelmente sexual na sua origem, tem sido tão importante que se tornou emblemático da medicina quer no mundo Romano quer mais tarde no Islâmico, após o desaparecimento do império romano, tendo-se tornado o reservatório da cultura médica antiga, Grega e Romana.²⁰ Na verdade, a imagem Tântrica e Asclépias das serpentes enroladas pode ser encontrada na Turquia, à entrada do antigo Hospital de Doenças Mentais onde Avicena da Pérsia praticava no século X-XI. Tendo em conta todos estes factos, R Toni sugere que tanto a simbolização Hipocrática-Asclépias como a da medicina Islâmica das serpentes enroladas, se referem a um único conceito de origem Tântrico-Hindu. Especificamente, o sistema nervoso central (esquematizado como o varão ou medula espinhal) é o receptor da informação ambiental e visceral (o *nagakkal* Tântrico ou as serpentes Brahâmicas *kundalini*) que são transferidas para centros de energia específicos (os *chakras* sagitalmente localizados ou transdutores neuroendócrinos ou glândulas) para amplificação e produção de efeitos sistémicos.⁴

Conceitos medieval, do renascimento e do princípio do século XX: no período medieval (século XIV) o anatomista italiano Mondino de’ Liuzzi, confiando em parte na fisiologia Galénica, escreveu na sua *Anathomia* que o terceiro ventrículo (a região hipotalâmica) podia integrar informação sensorial, emocional e cognitiva com o calor (concebido como um componente da energia vital) transferido da circulação sistémica a partir da glândula tiróide.²⁹ O que é notável é que Mondino tenha retirado parte desta ideia de Avicenna,³¹ cuja relação com a tradição Hipocrático-Galénica é bem conhecida.²⁰ Consequentemente, é tentador especular que um conceito da integração da energia a nível do cérebro já estaria localizado no local do hipotálamo onde os achados fisiológicos sobre homeostasia se vêm a confirmar na cultura ocidental moderna.²⁹ Por outro lado R Toni acredita na referência, que ele considera como das mais antigas observações da medicina

psicossomática, e que relaciona o sistema nervoso central e o sistema imunitário. Tal é devido a Leonardo Botallo que no seu *Trattato sui Doveri del Medico e del Malato*, publicado em 1565, escreve: *‘Vi sono poi quelli bruciati da una passione nascosta: in qualcuno arde un’idea repressa, turba altri un segreto timore, altri una non confessata preoccupazione e tutti questi stati d’animo sono causa e fomento di malattie... Conobbi in egual modo affetti da dolore al capo e lente febbri o altre malattie causate o alimentate da un’ira nascosta, da paura o passione...’* (existem aqueles que ardem por uma paixão escondida: em alguns um sentimento reprimido arde, outros são afligidos por um medo secreto, outros por uma preocupação não confessada, e todos estes sentimentos são causas e estímulos de doenças... Encontrei da mesma forma pessoas afectadas por dores de cabeça ou febres baixas ou outras doenças causadas ou alimentadas por uma raiva, medo ou paixão escondidas...). Actualmente está bem estabelecido que os nervos periféricos invadem os órgãos linfáticos, dando lugar a relações anatómicas e funcionais entre a informação nervosa e imunitária, estando na base do agravamento do papel desenvolvido pelas emoções e estados psicológicos nas infecções, nas doenças auto-imunes e eventualmente no cancro.^{4,13} Por outro lado, a ideia de que as entradas sensoriais a partir das estruturas endócrinas possam influenciar, através das vias ascendentes da espinhal medula, estados comportamentais foram antecipados pela prática clínica da ‘massagem do ovário’, proposta no contexto psiquiátrico no início do século XX para controlo dos aspectos do desencadeamento da neurose histerica.²⁰ Na verdade, foi demonstrado um controlo aferente sobre a activação neuroendócrina hipotalâmica da função ovárica em modelos animais pela Escola de Anatomia Húngara entre 1954 e 1984.^{4,32} De forma semelhante, após adrenalectomia unilateral, os núcleos hipotalâmicos ipsilaterais mostraram-se diferentes. Todos estes achados indicam que as glândulas endócrinas podem transmitir para o hipotálamo informações interoceptivas regulando a sua própria secreção. Estas aferências têm uma lateralização ao seu local de origem. Curiosamente, a lateralização do fluxo ascendente neuronal na regulação das glândulas endócrinas, é um conceito antecipado pela fisiologia Yoga. Em conclusão, poder-se-á afirmar que o conceito moderno das interacções neuroendócrino-imunológicas está ligado ao conceito de regulação homeostática através de visões filosóficas e clínicas milenares, algumas das quais têm evidência experimental nos tempos mais recentes. R Toni tenta ainda demonstrar como as especulações científicas recentes tiveram origem na necessidade de uma matriz biológica na qual não só as interacções neuroendócrino-imunológicas mas todas as funções das ‘secreções internas’ têm como objectivo uma homeostasia global e ampla, de forma a manter a integridade e aptidão do organismo durante o desenvolvimento, sobrevivência e evolução.⁴

Há mais de 40 anos que o anatomista e fisiologista britânico John Z Young, sugeriu que o papel último das secreções endócrinas era a regulação da informação genética durante a evolução.⁴ Esta sugestão é actualmente confirmada pela evidência de que nos vertebrados praticamente todas as hormonas clássicas, neuropeptídeos ou neurotransmissores, aminas e factores de crescimento contribuem para a regulação da homeostasia, fundamental à sobrevivência, assim como à morfogénese, desenvolvimento e reprodução. Esta regulação pode ser devida a uma acção genómica directa ou indirecta, modulação

genética^{33,34} pela via epigenética.³⁵ Assim, qualquer 'secreção interna' do sistema neuroendócrino está em posição de influenciar o genoma, quer directamente quer epigeneticamente. Por conseguinte ter-se-á que admitir que a ideia de uma acção isolada dos sistemas nervoso, endócrino, parácrino, autócrino ou mesmo intracrinico de comunicação para regular os estados fundamentais de homeostasia é excessivamente restritivo. Em um conceito biológico lato, a homeostasia é controlada por uma rede de 'secreções internas'.¹¹ Embora o conceito de 'secreções internas' seja muito vago, oferece uma visão mais vasta do que os anteriores mecanismos de retrocontrolo longo, curto e ultra-curto, processando a informação a qualquer nível do organismo, desde o sistema nervoso central até à célula única ou a elementos celulares. Especificamente, está ao nível de um 'super-sistema' de regulação, preenchendo fisiologicamente a necessidade básica de sobrevivência do organismo, isto é, do controlo da informação genética.⁴

Olhando esta necessidade morfo-funcional sob o ponto de vista moderno, parece que para atingir tal tarefa serão exigidas pelo menos três circunstâncias. Primeiro, tem que haver um sistema celular difuso a todos os compartimentos do organismo, para assegurar o mesmo tipo de comunicação a qualquer nível corporal. Segundo, o sistema celular deve ser capaz de auto-transmitir a informação de cada evento único, interno ou externo ao organismo, de natureza cognitiva ou não cognitiva, de forma a dar 'individualidade' à existência do organismo. Terceiro, cada um dos seus constituintes deve expressar uma correspondência funcional em relação ao organismo na sua globalidade, incluindo as necessidades de adaptação ambiental e evolucionista. Isto significa que é essencial ter estruturas celulares que divergem a nível embriológico e anatómico (por exemplo, glândulas endócrinas clássicas, células imunitárias, neurónios), capazes de exhibir 'localmente' actividades diversas (por exemplo, desempenho metabólico, reconhecimento de antigénios, acoplamento estímulo-resposta, respectivamente), mas todas expressando uma função unívoca no que respeita ao organismo. Esta função unívoca tem como objectivo a manutenção do balanço energético. A regulação homeostática, pode então, ser vista como o resultado de um mecanismo de selecção em que diferentes departamentos do organismo (ou partes deles) são sequencialmente recrutados na dependência do desafio da sobrevivência, usando a actividade de secreção interna como modalidade de comunicação.⁴

Para concluir, poder-se-á admitir um super-sistema informativo de secreções internas que actuam nos mamíferos, incluindo o homem, através de níveis de controlo progressivamente mais elevados: 1) sinais difusos autócrinos, parácrinos e endócrinos; 2) sistema nervoso autónomo; 3) eixo hipotálamo-hipofisário. O desempenho total deste super-sistema assegura o balanço homeostático durante a sobrevivência e a evolução nos animais vertebrados, incluindo o homem. Assim, o sistema neuroendócrino pode bem ser visto como parte de um complexo de organização de secreções internas, que abrange a linha central clássica do eixo hipotálamo-hipofisário, o sistema nervoso autónomo, o sistema imunitário, o sistema APUD bem como qualquer outro sistema de secreção

interna. Esta organização terá como finalidade última a regulação da estabilidade do genoma.⁴

O eixo hipotálamo-hipofisário: uma perspectiva histórica morfo-funcional

O reconhecimento da neuroendocrinologia e das doenças daí decorrentes pode ser igualmente reportado à antiguidade, nomeadamente ao antigo Egipto. Há dados históricos que documentam a existência de acromegalia nesta época, bem como os primórdios da neurocirurgia e da cirurgia transesfenoidal, que em muito se assemelham ao processo de trepanação por via nasal para posterior mumificação.³⁶

O hipotálamo (do idioma grego antigo ὑποθαλαμος, *sob o tálamo*) e a glândula hipofisária (*hipophysis* - origem grega - coisa pequena que cresce entre coisas grandes ou pituitária - *pituita* - origem latina - lodo, flegma, pois acreditava-se que ela absorvia e excretava fluido cerebral pela nasofaringe) atraíram o interesse de numerosos cientistas e artistas durante séculos, mesmo já na era antes de Cristo. A observação mais antiga da anatomia e da fisiologia da região hipotalâmica data do século II antes de Cristo por Galeno, em Pérgamo. Foi o primeiro a reconhecer o III ventrículo, devido à sua associação com a glândula pineal, tendo descrito no *De Usu Partium* o infundíbulo hipotalâmico e a hipófise como uma via de drenagem e receptáculo, respectivamente, para a passagem do muco ou flegma (*pituita* em latim) das estruturas ventriculares cerebrais para a nasofaringe. Designou ainda a rede capilar envolvendo a glândula hipofisária como a *rete mirabilis*.³⁷

O conceito científico de Galeno prevaleceu aproximadamente 1.200 anos até ao século XIV quando o anatomista Mondino de' Liuzzi, na Universidade de Bolonha, propôs a presença de múltiplas glândulas (*glandulae*) com procidência na *rete mirabilis* (correspondendo à hipófise e corpos mamilares), considerando o III ventrículo como um 'integrador' das funções corporais (informações sensoriais periféricas como emoções, memória e fantasia). No mesmo período Berengario de Carpi, dissecou cadáveres humanos na Universidade de Bolonha e negou a existência da *rete mirabilis* no hipotálamo, opondo-se portanto ao conceito Galénico da glândula hipofisária como receptáculo aos produtos de 'desperdício' do cérebro.

Contudo a autoridade de Galeno prevaleceu de tal forma nos séculos XV e XVI que veio a influenciar o trabalho de diversos artistas como Leonardo da Vinci, que deixou o esboço mais antigo do III ventrículo e da *rete mirabilis*. Algumas destas ideias foram posteriormente desenvolvidas e reformuladas, no século XVI, pelo anatomista Andreas Vesalius que terá descrito pela primeira vez as estruturas anatómicas da unidade hipotálamo-hipofisária, nomeadamente a haste infundíbulo-hipofisária.³⁷

O Renascimento foi um período áureo da história da Humanidade. Para além de Leonardo da Vinci (1452-1519), grande anatomista e neuroanatomista, que já em 1487 ilustrou os nervos e quiasma óptico em uma estrutura em forma de Y, temos *Michelangelo Buonarroti* (1475-1564) igualmente um grande anatomista, que 21 anos após inicia a pintura da abóbada da capela Sistina na qual possivelmente tentou reunir a arte e a ciência com os conhecimentos que tinha e que foi adquirindo. É aqui que poderemos especular o conceito da região hipotálamo-hipofisária. Durante dois anos (1503-1505), em Florença, contactou

com frequência com Leonardo tendo tido possivelmente acesso às suas ilustrações anatómicas. Para além deste contacto, ele próprio estudou e dissecou cadáveres, como mais à frente mencionado, e que lhe permitiram um profundo conhecimento anatómico. Apenas se pode inferir este conhecimento pelos detalhes das suas obras, uma vez que nada foi publicado e porque provavelmente destruiu todos os seus desenhos e notas. Considerando que durante toda a sua vida trabalhou para os Papas em Roma, e que na altura a igreja e o público em geral viam com alguma ambivalência a dissecação de corpos, não é de admirar que Miguel Ângelo não quisesse publicitar estas suas actividades, colocando em questão a sua posição no Vaticano. Foi em 10 de Maio de 1508 que, por indicação do Papa Júlio II, tiveram início as preparações para a pintura da capela Sistina. Miguel Ângelo pintou, na abóbada da capela, nove painéis centrais (5 menores e 4 grandes) que simbolizam cenas do *Livro da Génesis*. A história cronológica destes 9 painéis (desde a criação de Adão e Eva até à história de Noé) estende-se da entrada ao altar. Os 4 painéis ao longo do eixo longitudinal da abóbada, *Criação do Adão* (Genesis1: 26-27), *Separação da Terra da Água* (Genesis1: 9-10), *Criação do Sol e da Lua* (Genesis1: 14-19), e a *Separação da Luz das Trevas* (Genesis1: 3-5) são claramente distintos dos outros 5 painéis. Estes primeiros 5 painéis são mais narrativos e os últimos 4 enfatizam, de forma notória, Deus como figura central e Adão.³⁸ É neste período e obra de arte que a região do III ventrículo e do hipotálamo é então visionada por Miguel Ângelo como um local onde residiam elementos essenciais do espírito humano.^{37,39,40} Em uma dessas suas pinturas mais emblemáticas, a *Criação de Adão*, usou o cérebro, incluindo a região hipotálamo-hipofisária, como fundo da sua pintura para a descrição da criação da Humanidade. De facto, o local onde Deus reside antes de dar o seu espírito divino (intelectualidade) a Adão (considerado o ancestral da Humanidade) tem o contorno estilizado do cérebro e do complexo hipotálamo-hipofisário. No fresco da *Criação de Adão* não se tratará de uma criação mas de uma *dádiva ao Adão*. Este já está completamente criado, cuja perfeição e precisão da face e corpo foram largamente determinadas pelo idealismo Grego e pelos seus conhecimentos anatómicos. As capacidades sublimes de escultura e pintura que Miguel Ângelo tinha, não estariam nas mãos mas no cérebro, como ele próprio considerava. Assim sendo a sua mensagem seria a de que acreditava que a *parte divina* que se *recebia* de Deus era a *intelectualidade*. A imagem que circunda Deus e os Anjos tem a forma de um cérebro (reforçando a teoria de que Deus não daria apenas *vida* ao Adão mas também *inteligência*). A haste hipofisária e a hipófise estão representadas pela perna e pé esquerdos do anjo que se estende para a parte inferior do contorno do desenho. Repare-se que os pés de Deus e Adão têm cinco dedos; no entanto a região anterior da perna do anjo, que representa a haste hipofisária, tem um pé bífido simbolizando uma hipófise bilobulada, a hipófise anterior e posterior. Finalmente é interessante pensar no significado atribuído a *anjo* como *mensageiro* [do latim *angelus* e do grego *áγγελος* (ἄγγελος)]. Volta-se a sublinhar que estes grandes Mestres eram grandes anatomistas adquirindo os seus conhecimentos pela dissecação de cadáveres. O próprio Miguel Ângelo pedia a padres conhecidos e amigos para lhe permitir utilizar os cadáveres para os seus estudos de anatomia.^{37,39,40} Terá iniciado a dissecação de cadáveres aos 18 anos no mosteiro do Espírito Santo em Florença; estas dissecações teriam influenciado

posteriormente o conteúdo e a sua forma de pintar e esculpir, tendo servido como modelo de símbolos escondidos, nomeadamente, nos frescos da capela Sistina e ainda nas suas esculturas.⁴⁰ A sua retribuição pela permissão do estudo de cadáveres era feita em arte. Considerando Miguel Ângelo como um pintor de génio, um mestre de anatomia, e um homem profundamente religioso, não seria motivo de estranheza que desejasse engrandecer a sua descrição de Deus nos painéis iconograficamente críticos da abóbada da capela Sistina com imagens veladas do cérebro permitindo desta forma celebrar não só a glória de Deus, como também a Sua mais magnífica criação.³⁸ Esta interpretação de uma das mais emblemáticas obras de arte da Humanidade pode ser sujeita a críticas e, certamente, que terá diversas interpretações de acordo com o momento e o pensamento da época em causa. Na interpretação convencional, o eterno era circunscrito não simbolizado por um cérebro mas por uma elipse (simbolizando o *ovo cósmico*) composto do seu manto celestial de anjos espirituais e o Adão formava apenas um sistema ovóide incompleto.⁴⁰ Ao longo dos séculos a interpretação destes grandes Mestres foi-se alterando enormemente levando à interpretação atrás descrita. A possibilidade de que o contorno seja a representação de um cérebro é sustentada não só pela história pessoal de Miguel Ângelo (prática de dissecções anatómicas e pinturas que parecem conter diversas referências médicas) como também pela interpretação da filosofia Platónica de apropriação do cérebro como um símbolo *major* da pintura, a natureza da dádiva divina que nos faz verdadeiramente humanos.⁴⁰ Outro exemplo desta evolução do pensamento é a semelhança entre as faces de Deus e de Adão, que pode levar a considerar quem criou quem: será Deus a dar vida, espiritualidade (*intelectualidade*), a Adão ou será Deus um conceito da mente de Adão? Há que referir que a interpretação referida da *Criação de Adão* está muito dependente dos nossos conceitos e da nossa atenção em focar determinados detalhes e atribuir-lhes um significado. Esta capacidade de encontrar um significado para o observado está relacionada com o dom do cérebro para associações metafóricas; na verdade, o cérebro tem sido designado como uma máquina originadora de metáforas.⁴⁰

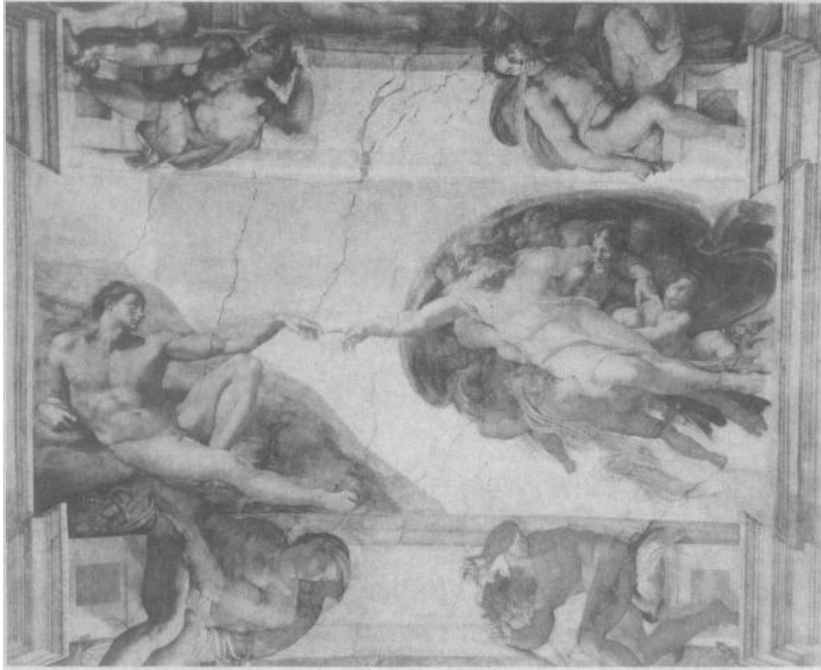


Figura da fotografia do fresco da *Criação de Adão* (1508-1512), por Miguel Ângelo na Capela Sistina no Vaticano. Jama 1990; 264: 1837-1841.

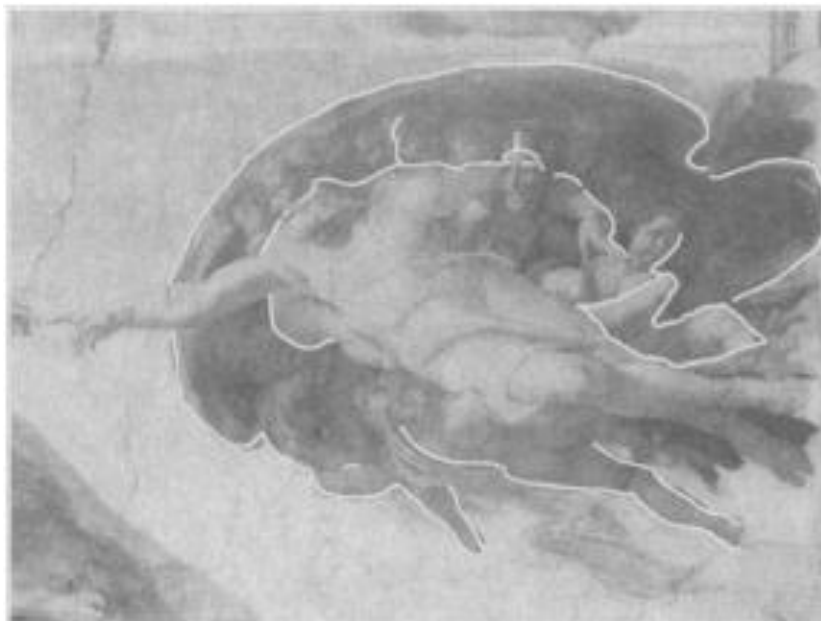


Figura de Meshberger FL. *An Interpretation of Michelangelo's Creation of Adam Based on Neuroanatomy*. Jama 1990; 264: 1837-1841. Detalhe do fresco, *Criação de Adão*, por Miguel Ângelo, na abóbada da capela Sistina no Vaticano, em Itália, pintado entre 1508-1512. A) Fotografia do fresco mostrando Deus a dar vida espiritual e intelectualidade ao Adão através do toque; B) O contorno da mesma imagem é uma reminiscência de uma secção sagital da linha média do cérebro que inclui o hipotálamo, hipófise e encéfalo.

A introdução do termo correcto ‘hipotálamo’ só ocorreu, contudo, em 1893 pelo anatomista suíço Wilhelm His. A introdução do termo ‘hipófise’ data de 1778 por Sommering. Em 1894 Ramon e Cajal descobriram no rato a conexão entre o hipotálamo e a hipófise posterior.⁴¹ A compreensão das funções da glândula hipofisária, como importante constituinte do sistema endócrino, só foi reconhecida na última metade do século XIX e início do século XX. Foi então entendida como o ‘maestro da orquestra endócrina’ embora estudos posteriores viessem a mostrar que a sua função estava sob a influência de estímulos externos e largamente dependente do controlo hipotalâmico.⁴² O termo ‘hormona’, traduzido do termo grego (ὄρμῶν) que significa excitar, foi pela primeira vez usado na primeira década do século XX por Bayliss e Starling para designar um processo em que mensagens químicas eram transmitidas a locais remotos no organismo através da corrente sanguínea.⁴³ O estudo da glândula hipofisária, que mais tarde foi assumida como ‘maestro’ ou *leader* da ‘orquestra endócrina’, manteve-se assim obscuro uma vez que seria difícil a sua remoção sem danificar as estruturas vizinhas.

Desde o tempo Galénico até ao início do século XX, a glândula foi pensada apenas como um depósito através do qual o muco nasal era removido do cérebro.⁴² Rathke descreve a formação da glândula em 1838. As primeiras referências à função da glândula hipofisária foram as atribuídas pelas doenças que a envolvem. A acromegalia, cujas características morfológicas foram conhecidas durante séculos, só foi reconhecida como uma entidade patológica por Pierre Marie na segunda metade do século XIX.^{42,44} No entanto a associação entre a doença e o alargamento da sela turca só foi reconhecido em 1887 por Minkowski, citado por Hutchinson.⁴² É conhecida a história de famosos gigantismos que atravessaram a História e que provavelmente teriam um tumor da hipófise. Contudo Marie considerou que haveria uma deficiência de função da glândula hipofisária.⁴² Em 1912 Harvey Cushing foi um dos pioneiros a postular que haveria uma ‘hormona do crescimento’ na hipófise, levando assim à fundação da hipótese de que uma hiperfunção da hipófise anterior seria responsável pelas manifestações da doença. Foi Cushing também que descreveu as manifestações da doença de Cushing em 1912 embora inicialmente pensasse que seriam de origem primária da supra-renal. Só em 1932 é que numa publicação demonstrou ter mudado ao atribuir a doença a um adenoma basófilo da hipófise. O esclarecimento da fisiopatologia das doenças atribuídas à glândula hipofisária teve que aguardar a evolução e o desenvolvimento de métodos químicos para o isolamento das hormonas segregadas por esta glândula. O esforço para o isolamento de formas cristalinas puras destas proteínas começou a dar resultados na terceira e quarta décadas do século XX. A prolactina (PRL) foi das primeira hormonas a ser isolada por Riddle *et al.*, em 1933, tendo sido descrito o isolamento da sua forma cristalina em 1937, por White *et al.* A identificação da hormona luteotrófica (LH) e foliculoestimulante (FSH), a partir da extracção de urina e hipófises humanas, deve-se a Segaloff e Steelman, em 1959, que também reconheceram diferentes funções para estas hormonas. Em 1942, Li *et al.*, isolaram a corticotrofina (ACTH) a partir de hipófises de carneiro. A estrutura da tirotrófina (TSH) foi publicada por Pearse e Parsons em 1981. A extracção da hormona do crescimento ou somatotrofina (GH) pura de hipófises bovinas foi pela primeira vez referida por Li e Evans em 1944. Knobil e Greep mostraram que a somatotrofina bovina e porcina tinham profundos efeitos anabólicos em

ratos e cães. Shelton descreveu pela primeira vez o efeito da somatotrofina de extracção animal no humano embora admitindo que poucos doentes beneficiavam com o tratamento. O uso da hormona biossintética com os mesmos efeitos anabólicos da de extracção animal ocorreu em 1982 por Hintz *et al.*⁴²

Embora o reconhecimento de que a diabetes insípida era uma entidade distinta da diabetes mellitus se date de há muitos anos (Frank em 1794) foi só em 1912 que Alfred Erich Frank a relacionou, pela primeira vez, com a hipófise posterior. Howell, em 1988, já tinha demonstrado que a hipófise posterior continha substâncias vasopressoras. Extractos neurohipofisários com propriedades estimuladores da secreção láctea foram descritos por Oliver *et al.*, em 1895. O conhecimento do papel da hipófise posterior na regulação do metabolismo hídrico foi complicado, devido à vasopressina e ocitocina serem sintetizadas nos núcleos hipotalâmicos paraventriculares e supra-ópticos.⁴²

Em 1995, Vincent du Vigneaud recebe o Prémio Nobel de Química pelo seu trabalho pioneiro ao demonstrar que as hormonas polipeptídicas podiam ser sintetizadas mantendo os efeitos biológicos idênticos aos das hormonas no seu estado natural.⁴² Desde então muito se tem continuado a evoluir nesta área do conhecimento, atingindo a dimensão molecular e a sua aplicação às diferentes áreas deste componente do saber, a endocrinologia.

1.3. Anatomia e embriologia

A hipófise normal localiza-se na base do cérebro, na linha média, tendo como dimensões médias no adulto 0,6 cm (diâmetro vertical) x 0,9 cm (diâmetro anterior-posterior) x 1,3 cm (diâmetro mediolateral) e um peso médio de 600 mg (500-900 mg).⁴⁵ A hipófise no sexo feminino tem um peso ligeiramente superior, particularmente na mulher múltipara.^{46,47} Aloja-se na base do crânio, na sela turca do osso esfenóide, e tem como relações: superiormente o diafragma selar, o quiasma (jaz 5 a 10 mm acima do diafragma da sela e anterior à haste hipofisária) e os nervos ópticos e o hipotálamo; lateralmente os seios cavernosos bem como as artérias carótidas internas e os III, IV, V e VI pares cranianos;¹ antero-inferiormente o seio esfenoidal. A glândula é rodeada por tecido fibrótico que forma a cápsula.⁴⁵ É circundada pela dura-máter, sendo o tecto formado por uma dobra desta com fixação às apófises clinóides, o diafragma da sela. Este impede a entrada na sela turca da aracnóide e do líquido cefalorraquídeo mas não da haste da hipófise e dos seus vasos sanguíneos que passam através de uma abertura específica.

É composta por duas partes anatómicas e funcionais distintas: a adenohipófise e a neurohipófise. A neurohipófise é de origem neuronal, surgindo durante o desenvolvimento embrionário como uma evaginação do hipotálamo ventral e do terceiro ventrículo. É composta pelo infundíbulo, a haste hipofisária e a *pars nervosa* ou lobo posterior da hipófise.⁴⁵ As suas células incluem pituicitos, que são células da glia modificadas, e os axónios de neurónios cujos corpos celulares se localizam nos núcleos supra-ópticos e paraventriculares do hipotálamo. Armazena e liberta as neurohormonas hipotalâmicas, ocitocina e vasopressina, e hormonas tróficas hipofisárias que regulam a

produção hormonal pelas células epiteliais da adenohipófise.⁴⁵ Os primórdios fetais da hipófise anterior humana são reconhecíveis nas quarta e quinta semanas de gestação e a rápida diferenciação citológica leva a uma unidade hipotálamo-hipofisária madura já na vigésima semana. A adenohipófise é uma glândula epitelial de origem endodérmica. Embrionariamente deriva da bolsa de Rathke, uma evaginação ectodérmica da orofaringe, que migra para se unir à neurohipófise. É composta por três regiões, a *pars distalis* ou lobo anterior, a *pars intermédia* ou lobo intermédio e a *pars tuberalis* uma extensão para a haste hipofisária. A adenohipófise é constituída por ácinos de células especializadas na produção de hormonas em um estroma rico em reticulina. Estas células incluem corticotrofos, somatotrofos, mamossomatotrofos, tirotrofos, lactotrofos e gonadotrofos. As células folículo-estelares são células de sustentação do estroma que envolvem os ácinos; parecem relacionadas com a glia uma vez que expressam marcadores específicos desta como a proteína S100 e a proteína ácida fibrilar da glia.⁴⁵

O desenvolvimento da adenohipófise e a sua citodiferenciação são regulados por factores de transcrição altamente específicos.⁴⁸ Estes, por vezes designados de factores específicos de determinada sequência de ADN, são proteínas que se ligam a uma particular sequência de ADN e que, por consequência, controlam a transferência (ou transcrição) da informação genética do ADN para o ARN mensageiro (ARNm). A proteína homeobox Pax-6 (*Rpx*) da bolsa de Rathke, o factor homeobox bicoid relacionado com a hipófise Ptx-1, e o factor homeobox 2 estruturalmente relacionado com a hipófise (Ptx-2), são todos necessários para a organogénese hipofisária precoce. Os genes homeobox LIM - Lhx3, Lhx4, e P-LIM – são expressos em níveis elevados nos estádios precoces do desenvolvimento da bolsa de Rathke. Outro determinante precoce do desenvolvimento hipofisário é o Profeta do Pit-1 (Prop1) que induz a expressão da fase seguinte do desenvolvimento pela transcrição do factor Pit-1, desempenhando ainda um papel de sub-regulação do *Rpx* que é necessário à diferenciação celular. Os factores moleculares que determinam a diferenciação celular e a produção hormonal nas células da hipófise anterior, são factores de transcrição que se direccionam para genes específicos de determinadas hormonas.⁴⁵ Os factores de transcrição estão envolvidos nas três vias principais de diferenciação celular: 1) Os somatotrofos, lactotrofos, mamossomatotrofos e tirotrofos, que representam cerca de 50% da população celular, derivam das células precursoras dos somatotrofos que expressam o factor de transcrição Pit-1. A expressão do receptor α dos estrogénios (ER- α) coopera com o Pit para potenciar a secreção de prolactina e permitir a diferenciação dos mamossomatotrofos; para o desenvolvimento dos lactotrofos maduros existe um mecanismo silenciador de repressão da GH. O factor embrionário dos tirotrofos (TEF) é o factor potencial requerido para a produção da β -tirotrofina,⁴⁹ e o GATA-2 parece ser um importante contributo no desenvolvimento dos tirotrofos.⁵⁰ Os tirotrofos maduros também requerem a supressão da expressão da GH. Pode ocorrer um processo de transdiferenciação entre estas células em diversas situações, que se pensa ser reversível.⁴⁵ 2) Os corticotrofos, que produzem a pró-opiomelanocortina (POMC) e seus derivados adrenocorticotrofina (ACTH), melanotrofina (MSH), endorfinas e lipotrofina (LPH) representam 15 a 20% das células adenohipofisárias. A expressão da pró-opiomelanocortina é dependente do factor de transcrição Tpit que interage com Ptx1 e

com *corticotrofin upstream transcription-binding element* (CUTE) das proteínas, incluindo neuroD1/beta 2. 3) A diferenciação dos gonadotrofos está dependente da expressão do factor esteroidogénico (SF-1) e GATA-2. Representam cerca de 10% das células hipofisárias. Com o aumento da idade estas células tendem a sofrer metaplasia oncocítica e escamosa. Existem ainda células que não são hormonalmente activas: a maioria terá origem nos gonadotrofos uma vez que possuem marcadores imunohistoquímicos indicadores desta diferenciação, outras não são classificáveis pelo que são designadas de células nulas (*null cell*) e ocasionalmente ainda existem oncócitos.⁴⁵

Na figura seguinte, está esquematizada a citogénese da hipófise anterior.

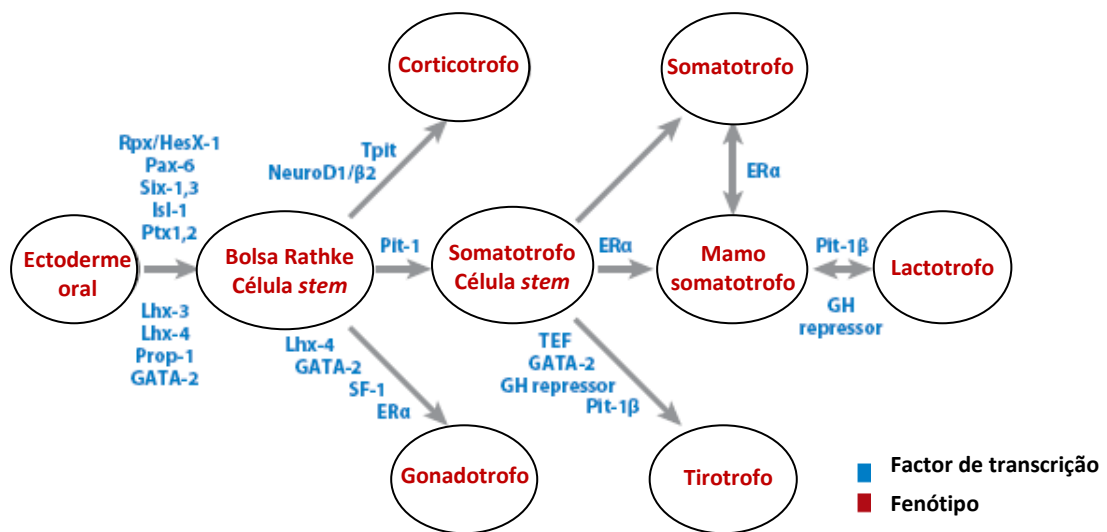


Figura adaptada de Asa SL, Ezzat S. *The pathogenesis of pituitary tumors*. Annu Rev Pathol Mech Dis 2009; 4: 97-126. Citogénese da hipófise anterior. A hipófise anterior deriva da ectoderme oral em um processo conduzido por uma série de factores de transcrição que determinam a origem da bolsa de Rathke e as três linhas distintas de diferenciação celular. A diferenciação dos corticotrofos e gonadotrofos é um processo terminal. As células da família Pit-1 podem sofrer transdiferenciação de e para o fenótipo dos somatotrofos, lactotrofos e tirotrofos.

A hipófise anterior é dos tecidos mais ricamente vascularizado entre os tecidos dos mamíferos, recebendo cerca de 0,8 mL/g/min a partir da circulação porta que a liga à eminência média do hipotálamo. A vascularização está dependente das artérias hipofisárias superior, média e inferior com origem nas artérias carótidas internas. A artéria hipofisária superior entra no infundíbulo da neurohipófise formando os vasos porta que transportam as neuro-hormonas do hipotálamo para a hipófise anterior. A artéria hipofisária intermédia vai directamente à hipófise anterior e a artéria hipofisária inferior irriga a *pars nervosa*. O sistema venoso drena maioritariamente para os seios cavernosos, e daí para os seios petrosos, superior e inferior, e veias jugulares internas podendo contudo haver um fluxo retrógrado com eventual repercussão na função da adeno e neurohipófise.⁴⁵

1.4. Desenvolvimento, histologia e fisiologia normal do eixo hipotálamo-hipofisário

A hipófise anterior é uma glândula heterogénea com múltiplos tipos de células que produzem diferentes hormonas com funções únicas. As células da hipófise anterior foram originalmente classificadas como células acidófilas, basófilas e cromóforas com base na sua coloração pela hematoxilina e eosina. A imunocitoquímica e microscopia electrónica tornaram possível a classificação das células de acordo com a sua especificidade hormonal em somatotrofos (células produtoras de somatotrofina), lactotrofos (células produtoras de prolactina), tirotrofos (células produtoras de tirotrofina), corticotrofos (células produtoras de corticotrofina e peptídeos afins) e gonadotrofos (células produtoras de hormona luteinizante e foliculoestimulante). O desenvolvimento da glândula hipofisária e a emergência dos distintos tipos celulares desde as células primordiais comuns são controlados por factores de transcrição já anteriormente citados.

O eixo hipotálamo-hipofisário constitui a principal interface entre o sistema nervoso e o sistema endócrino. Esta interface tem como função principal amplificar o sinal das neurohormonas hipotalâmicas originando concentrações mais elevadas das hormonas hipofisárias bem como modelar a sua regulação temporal e secreção circadiana. As funções desta interface são modificadas por retrocontrolos, habitualmente negativos, via sistema nervoso e sistema endócrino.

Somatotrofos e regulação da somatotrofina (GH)

A somatotrofina é sintetizada, armazenada e segregada pelos somatotrofos. A GH exerce um largo espectro de efeitos que levam ao crescimento e à regulação do metabolismo dos hidratos de carbono, dos lípidos, das proteínas e dos sais mineiras. Estes efeitos podem resultar da acção directa da GH nos tecidos periféricos ou indirectamente através da síntese de IGF-1 a nível hepático e de outros tecidos, sendo que cerca de 80% da IGF-1 circulante tem origem hepática.⁵¹ Os somatotrofos representam cerca de 50% das células da hipófise anterior com localização preferencial nas regiões laterais do lobo anterior. São caracteristicamente células acidófilas e com imunopositividade para a GH e Pit-1. Um pequeno número tem imunopositividade para a GH e prolactina, os mamossomatotrofos. O diâmetro dos grânulos à microscopia electrónica é de 150-600 nm. Como já referido os dois factores de transcrição particularmente envolvidos na diferenciação dos lactotrofos, somatotrofos e tirotrofos são o Prop-1 e o Pit-1. Mutações do Pit-1 condicionam deficiências de GH, prolactina e TSH; mutações do Prop-1 associam também a deficiência das gonadotrofinas e ocasionalmente da reserva de corticotrofina. Estas deficiências são frequentemente progressivas ao longo do tempo.⁵²

O locus da GH localiza-se no cromossoma 17q22-q24 e associa mais 4 genes homólogos todos com origem em um gene ancestral.

A GH é um peptídeo de 191 aminoácidos que existe na circulação em diversas formas modificadas. Na secreção espontânea, a isoforma completa de 22 kDa representa cerca de 73%, a isoforma alternativa de 20 kDa 16% e a forma desaminada, 'ácida', cerca de 10%. Outros fragmentos podem ser identificados (30 kDa, 16 kDa e 12 kDa).⁵³ A sua semi-vida sérica é de cerca de 20 a 25 minutos.⁵⁴

A regulação da secreção de GH está dependente de numerosos peptídeos e de hormonas não peptídicas. O controlo neuroendócrino é efectuado pela somatoliberina (GHRH) e pela somatostatina (SS). A GHRH é um peptídeo de 44 aminoácidos, sintetizado e segregado a nível do núcleo arcuato hipotalâmico, constituindo o principal regulador estimulador da GH. Liga-se aos receptores acoplados às proteínas G activadoras activando a adenil ciclase, com consequente elevação dos níveis de AMPc e mobilização do cálcio intracelular, e subsequente estimulação e transcrição do gene da GH. Adicionalmente pode levar à hiperplasia dos somatotrofos. A somatostatina é derivada de uma pré-pro-hormona de 116 aminoácidos que dá origem a duas formas principais, somatostatina-28 (SS-28) e somatostatina-14 (SS-14). O peptídeo de 14 aminoácidos tem uma larga distribuição pelo sistema nervoso central. É sintetizada a nível dos núcleos periventriculares e, após a sua libertação no sistema porta, liga-se a pelo menos cinco receptores distintos (sst), dos quais os subtipos 2 e 5 são os mais frequentes na hipófise e que têm efeitos mais potentes na secreção da GH. A ligação da somatostatina aos seus receptores leva a uma activação das proteínas G inibidoras, que por sua vez resulta em diminuição dos níveis de AMPc e inibição da secreção de GH. A somatostatina não inibe a secreção basal da GH, mas apenas a que é induzida pela GHRH. Por sua vez a secreção de somatostatina está dependente de neuropeptídeos e aminas reguladoras bem como de aferências periféricas.⁵¹

A somatostatina também é produzida em células especializadas existentes em diversos outros órgãos, tais como o cérebro, aparelho digestivo, fígado, pâncreas, pulmão e glândulas supra-renais. Para além da larga distribuição pelo organismo das células produtoras de somatostatina, os seus peptídeos têm várias acções, embora primariamente de inibição, nas secreções exócrina e endócrina. No cérebro, a somatostatina actua como um neurotransmissor, com ambas as actividades de inibição e de estimulação. Um dos órgãos em que tem um importante efeito predominantemente de inibição da secreção hormonal, é precisamente a nível da hipófise anterior.⁵⁵ A somatostatina actua via sete receptores transmembranares acoplados às proteínas G (sst). Cinco foram clonados e caracterizados, tomando as designações de sst1, sst2, sst3, sst4, sst5.⁵⁶ Estes cinco subtipos partilham vias de sinalização comuns, embora cada subtipo particular active também outras vias de sinalização. As vias melhor caracterizadas são as da inibição da actividade da adenil ciclase (diminuindo o AMPc intracelular), a diminuição do influxo de Ca^{2+} e activação da fosfotirosina fosfatase (PTP).⁵⁷ A activação da fosfotirosina fosfatase tem um papel primordial no efeito inibitório dos análogos da somatostatina (SSA) na proliferação celular por inibição das cinases das tirosinas, ciclinas, e estabilização ou bloqueio do ciclo celular.⁵⁸ Com base nas características estruturais e farmacológicas, foram definidas duas classes de receptores. Uma classe, consistindo nos sst2, sst3, sst5, a

que se ligam os análogos da somatostatina com elevada ou relativa afinidade e outra classe, dos sst1 e sst4, desprovida desta capacidade de ligação.⁵⁹

A somatostatina tem múltiplas funções de acordo com os órgãos em que é produzida, nomeadamente hipofisárias, pancreáticas, digestivas e hepáticas, entre outras:

- a) Inibe directamente a secreção de GH pelos somatotrofos e antagoniza a actividade secretagoga de GH pela ghrelina
- b) Inibe indirectamente a secreção de GH, pela inibição da GHRH
- c) Inibe indirectamente a secreção de GH, pela inibição da secreção de ghrelina pelo estômago
- d) Inibe a secreção de TSH e a estimulação da secreção de TSH pela TRH, na hipófise
- e) Inibe a secreção de colecistocinina, glucagon, gastrina, secretina, peptídeo gastrointestinal (GIP), insulina e polipeptídeo intestinal vasoactivo (VIP), no aparelho digestivo

A ghrelina, peptídeo de 28 aminoácidos, é o factor regulador da GH mais recentemente descoberto. Foi isolado no estômago embora também esteja presente no hipotálamo e em outros tecidos. Liga-se a um receptor secretagogo específico da GH (GHS) nos somatotrofos estimulando a secreção da GH. Os receptores GHS foram também identificados no hipotálamo de modelos animais com efeitos directos na libertação da GHRH.^{60,61} Embora os seus níveis periféricos estejam sobretudo dependentes do estado nutricional, o seu papel na regulação da secreção de GH ainda não é perfeitamente conhecido.

Outros factores implicados na secreção da GH são:

Regulação intra-hipofisária: para além do papel das hormonas hipotalâmicas na génese da pulsatilidade da GH, parece existir na hipófise anterior uma rede de ligação apertada entre os somatotrofos que integra e amplia os sinais emitidos pelo hipotálamo.⁶²

Pulsatilidade da secreção de GH: em situações basais há cerca de 8 a 12 pulsos nas 24h.⁶³ No homem, cerca de 70% da secreção de GH ocorre nas primeiras horas da noite com a indução do sono.⁶⁴ Na mulher haverá maior número de pulsos durante o dia, sendo a secreção basal relativamente superior.⁶⁵ A pulsatilidade da GH é também afectada pelo estado nutricional: a obesidade motiva uma diminuição e o jejum um aumento dos pulsos.⁶⁶ De acordo com estudos em humanos⁶⁷ e em modelos animais⁶⁸ o principal regulador da pulsatilidade da GH parece ser a GHRH.

Idade: a secreção de GH é máxima na puberdade mantendo-se significativa até à terceira década de vida, a partir da qual vai diminuindo progressivamente.⁵¹

Regulação pelo retrocontrolo: existe um sistema complexo de retrocontrolo a diferentes níveis. No hipotálamo, a GH estimula a libertação de somatostatina e inibe a libertação de GHRH; a IGF-1 tem uma acção semelhante a nível do hipotálamo, associando uma acção inibitória directa da secreção de GH a nível hipofisário. No hipotálamo a somatostatina inibe a libertação de GHRH e a GHRH estimula a libertação de somatostatina.⁵¹

Nutrição: a GH tem efeitos metabólicos, e os diferentes nutrientes afectam a sua secreção. A hiperglicemia inibe-a e a hipoglicemia estimula-a, parecendo estes efeitos ser mediados

pela GHRH e somatostatina. A GH estimula a captação dos aminoácidos e a síntese proteica. Por sua vez os aminoácidos, particularmente a arginina, estimulam a sua secreção. A GH tem um profundo efeito lipolítico e os ácidos gordos livres, por sua vez, causam a sua supressão pela inibição da estimulação da GHRH (o que sugere um efeito mediado pelo aumento de libertação de somatostatina).^{69,70,71,72}

Hormonas das gónadas: a activação dos esteróides gonadais na puberdade e o seu declínio com a idade, estão em paralelo com as alterações de secreção da GH, embora uma relação causal entre os dois não tenha, ainda, sido plenamente demonstrada. Nos humanos a evidência aponta para um efeito estimulador dos estrogénios, mas não para os androgénios, à excepção dos aromatizados. Os estrogénios e androgénios têm um efeito contrário a nível hepático na secreção de IGF-1; os estrogénios inibem e os androgénios estimulam esta secreção.⁷³

Glicocorticóides e hormonas tiroideias: o hipercortisolismo crónico induz uma diminuição da resposta da GH à estimulação. Este efeito pode ser exercido a nível hipofisário e hipotalâmico. A resposta da GH também está diminuída no hipotiroidismo e no hipertiroidismo. As hormonas tiroideias são necessárias à expressão do gene da GH, mas os seus efeitos também são decorrentes de uma acção a nível hipotalâmico.⁵¹

Lactotrofos e regulação da prolactina (PRL)

A prolactina é sintetizada, armazenada e segregada pelos lactotrofos, que representam cerca de 10 a 25% das células da hipófise anterior.⁷⁴ Contudo esta percentagem aumenta drasticamente, até aproximadamente 40% do total, em resposta a níveis elevados de estrogénios, particularmente durante a gravidez.^{74,75} Os lactotrofos têm igualmente uma coloração acidófila estando dispersos pelo lobo anterior. À microscopia electrónica o diâmetro dos grânulos tem em média 550 nm podendo ser distinguidos dois tipos de células em função da granulação, escassa e densa. Os lactotrofos derivam dos mamossomatotrofos (precursor comum aos lactotrofos e somatotrofos) sendo as últimas células a sofrerem diferenciação no decurso do desenvolvimento embrionário.⁷⁵ Este envolve a expressão sequencial de um conjunto de factores de transcrição, nomeadamente o Pit-1 e o Prop-1, essenciais não só à diferenciação dos lactotrofos como também à transcrição da prolactina.⁷⁶ Mutações destes genes condicionam insuficiências hipofisárias múltiplas de GH, prolactina, TSH e ainda de gonadotrofinas ou, mais raramente, de ACTH.⁵²

O locus codificador do gene da prolactina localiza-se no cromossoma 6p22.2-p21.3 e tem 16% de homologia com a somatotrofina e com a gonadotrofina coriónica humana, cujo locus está presente no cromossoma 17.

A prolactina é constituída por uma cadeia polipeptídica de 198 aminoácidos, com um peso molecular de 23 kDa, que partilha extensa semelhança estrutural com a GH e menos significativamente com as hormonas peptídicas da família das interleucinas.⁷⁷ A principal função fisiológica, clássica, da prolactina é a estimulação da lactação, regulação da

reprodução e modelação do comportamento materno. A prolactina é necessária para a manutenção da proliferação das células ductais, e conjuntamente com a progesterona é responsável pelo despoletar da proliferação e diferenciação das unidades lobulares mamárias essenciais ao processo de lactação.^{78,79} A nível molecular, a prolactina promove a activação da expressão dos genes necessários à lactação e à proliferação celular.⁷⁷ Os seus efeitos fisiológicos são mediados através do seu receptor que pertence à família dos receptores das citocinas do tipo 1.⁸⁰ A activação do receptor da prolactina envolve a sua dimerização, induzida pelo ligando, com activação da cinase *Janus 2* (JAK2), que leva à fosforilação da tirosina de receptores de outras proteínas, como por exemplo a activação do sinal de transdução de proteínas activadoras de transcrição (STAT 1-5) e cinases Src-relacionadas (SH2-PK).^{74,75,80} Os receptores têm uma distribuição muito extensa sendo o fígado, ovários e glândulas mamárias, os tecidos com maior concentração.⁸¹

A regulação hipotalâmica efectuada pela dopamina é, ao contrário das outras hormonas hipofisárias, inibitória. O cérebro contém diversos sistemas reguladores dopaminérgicos, dos quais o sistema hipotalâmico tubero-infundibular é o principal regulador da prolactina. A dopamina inibe a libertação de prolactina, a expressão do gene da prolactina e a proliferação dos lactotrofos. Os receptores da dopamina são membros da família dos receptores acoplados às proteínas G. O receptor do tipo 2 (*D2-like*) é o envolvido na inibição da prolactina e interage com as proteínas G_i inibindo a adenil ciclase e o metabolismo do fostato do inositol. A inibição da libertação de prolactina ocorre em segundos após a ligação ao receptor D2, seguida da hiperpolarização da membrana celular e inibição dos canais de cálcio dependentes da voltagem. A inibição da expressão do gene da prolactina acontece em minutos a horas. A inibição da proliferação dos lactotrofos decorre em dias e é mediada pelo bloqueio das funções do AMPc que, nos lactotrofos, são mitogénicas.⁵¹

A dopamina é o neurotransmissor catecolaminérgico dominante no sistema nervoso central humano; controla uma variedade de funções incluindo a cognição, emoção, locomoção activa, fome e saciedade. A nível periférico, modula a função cardiovascular e renal, a motilidade gastrointestinal, bem como o sistema endócrino, incluindo a secreção hipofisária.⁸² Foram identificados cinco subtipos de receptores, designados de D1, D2, D3, D4 e D5. Os genes codificadores dos receptores da dopamina estão localizados em diferentes loci cromossómicos apresentando uma considerável homologia estrutural e de função.⁸² Com base nas suas relações de estrutura e função, foram identificadas duas classes de receptores: *D1-like* (frequentemente designados de receptores D1), que inclui D1 e D5, e *D2-like* (frequentemente designados de receptores D2), incluindo D2, D3 e D4. Os receptores *D1-like* estão habitualmente associados a uma função de estimulação e os *D2-like* a uma função de inibição.⁸² A dopamina liga-se a todos os subtipos de receptores da dopamina. Os agonistas da dopamina, nomeadamente a bromocriptina ligam-se preferencialmente aos receptores *D2-like*, embora também se liguem aos *D1-like*. A cabergolina, à semelhança da bromocriptina, liga-se aos receptores D1- e *D2-like* mas com maior afinidade para ambos os receptores e maior selectividade para os *D2-like*.⁸³

Mecanismos importantes de tradução do sinal incluem a modulação da actividade da adenil ciclase e da fosfolipase C, bem como das actividades dos canais de cálcio e de potássio. É geralmente aceite que os receptores *D1-like* estimulam e os *D2-like* inibem a actividade da adenil ciclase e a acumulação intra-celular do AMPc.^{82,84} Contudo, os dados na literatura são conflituosos sobre os diferentes segundos mensageiros induzidos pela activação dos receptores da dopamina, o que pode ser consequência do estudo destes mecanismos em diferentes tecidos e linhas celulares.^{55,82}

Diversas linhas de evidência sugerem que os receptores da dopamina e somatostatina podem formar heterodímeros. A heterodimerização dos receptores da dopamina e da somatostatina pode ter influência na ligação, sinalização e internalização dos respectivos receptores. A heterodimerização dos receptores sst5 e D2 resulta numa nova conformação destes com aumento da sua actividade funcional em termos de inibição da acumulação do AMPc, bem como na maior afinidade para ambos os agonistas da dopamina e da somatostatina, promovendo ambos a formação de hetero-oligómeros D2-sst5.⁸⁵ A co-expressão de ssts e D2 na mesma célula hipofisária poderá ter um impacto potencial positivo na sensibilidade destas células aos agonistas da dopamina ou análogos da somatostatina.⁵⁵

A prolactina tem um mecanismo de auto-regulação, em que níveis elevados vão condicionar aumento da síntese de dopamina e consequente inibição da sua produção. Este mecanismo de retrocontrolo é mediado através da modulação da actividade da hidroxilase da tirosina. A elevação da prolactina leva a um aumento desta via e consequentemente aumento da síntese de dopamina. No entanto, esta auto-regulação ainda não está perfeitamente esclarecida, sendo que este mecanismo parece ter sido perdido em algumas situações fisiológicas e patológicas, como a gravidez, lactação e a existência de prolactinomas, todas associadas a níveis elevados de prolactina.^{75,80}

São conhecidos diversos factores libertadores de prolactina, nomeadamente, TRH, ocitocina, GH, estrogénios e nos humanos, ainda, o início do sono.

Tirotrofos e regulação da tirotrófina (TSH)

A TSH é sintetizada, armazenada e segregada nos tirotrofos que representam aproximadamente 5% das células da hipófise anterior, o menos comum dos tipos celulares da hipófise anterior. É um heterodímero glicoproteico de 28 kDa constituído pela subunidade- α e subunidade- β . A subunidade- α é comum às gonadotrofinas (FSH, LH) e à gonadotrofina coriónica (hCG) e contém 92 aminoácidos. A subunidade- β contém 110 aminoácidos, é única nos tirotrofos e é a que confere a especificidade da acção biológica. Ambas as subunidades são glicosiladas sabendo-se que a glicosilação é essencial para uma acção biológica óptima.⁸⁶ As células são basófilas devido ao conteúdo glicoproteico evidenciando também coloração positiva pelo ácido periódico de Shiff (PAS). Os grânulos

são pequenos de 50-100 nm. Tais células localizam-se habitualmente nas porções anteromedial e anterolateral da glândula, exibindo notável hipertrofia em estados de insuficiência tiroideia primária.

A TSH é codificada por dois loci, um da subunidade- α , no cromossoma 6p12-q21, e o outro, da subunidade- β que confere a especificidade à hormona no 1p13.

A principal neuro-regulação é mediada pela TRH, um tripeptídeo, que por sua vez é regulado por diversos neuropeptídeos, incluindo a leptina, pró-opiomelanocortina, neuropeptídeo Y (NY), *agouti-related peptide* (AGRP), e *cocaine- and amphetamine-related transcript* (CART), que medeiam a influência do metabolismo na secreção das hormonas da tiróide.^{87,88} A somatostatina e a dopamina inibem a TSH, embora menos potentes nos tirotrofos do que nos somatotrofos.^{89,90} Contudo, terapêuticas prolongadas com análogos da somatostatina ou com agonistas da dopamina, habitualmente não induzem hipotiroidismo.

A secreção da TSH está fundamentalmente dependente da interligação da TRH e das hormonas da tiróide. A TRH estimula e as hormonas da tiróide inibem a transcrição de ambas as subunidades α e β . Também parece relevante a capacidade de regulação autocrínica e paracrínica nos tirotrofos.

A secreção de TSH vai diminuindo com a idade. Embora os níveis de tiroxina (T4) permaneçam normais, a relação T3/T4 diminui na oitava e nona décadas da vida. Não se conhecem exactamente quais as implicações fisiológicas destas alterações, à excepção da necessidade de na prática clínica reduzir em cerca de 20% a dose de levotiroxina em doentes sob tratamento com esta.⁹¹

O retrocontrolo das hormonas da tiróide sobre a secreção de TSH ocorre fundamentalmente a nível hipofisário, embora também tenham influência a nível hipotalâmico, particularmente em situações patológicas mais arrastadas. Há ainda retrocontrolos mais curtos, nomeadamente da TSH a nível hipotalâmico (TRH) e mesmo intra-hipofisário da TSH.⁹² Este último mecanismo parece envolver as células foliculo-estelares, que expressam receptores da TSH. O seu papel fisiológico poderá ser importante na regulação mais delicada da pulsatilidade da TSH.⁵¹

Efeitos nutricionais: as concentrações de TSH, T3 e T4 diminuem com o jejum, curto ou prolongado, e a desnutrição bem como a pulsatilidade e secreção circadiana da TSH. O factor implicado neste mecanismo parece ser a diminuição da produção de leptina que ocorre com a privação alimentar. A leptina estimula directamente o ARN mensageiro da TRH e indirectamente interfere com a TRH hipotalâmica através de outros neuropeptídeos hipotalâmicos que regulam a homeostase dos nutrientes.⁹³

Exercício e stresse: a actividade física aguda induz uma elevação da TSH, particularmente durante a noite quando a sua secreção é mais elevada.⁹⁴ O mecanismo ainda não está esclarecido. O stresse, por sua vez, está associado a uma diminuição da activação do eixo hipotálamo-hipófise-tiróide. Esta inibição é, em parte, resultante de efeitos indirectos de

retrocontrolo negativo no hipocampo, que contrabalançam o efeito estimulador directo dos glicocorticóides na produção de TRH.⁹⁵

Corticotrofos e regulação da corticotrofina (ACTH)

A síntese e secreção dos glicocorticóides pelo córtex supra-renal estão dependentes do eixo hipotálamo-hipofisário. Os glicocorticóides são fundamentais na manutenção do tónus vascular, integridade endotelial, contractilidade cardíaca, e resposta ao stress.⁵¹

A corticotrofina (ACTH) e peptídeos afins são sintetizados, armazenados e libertados pelos corticotrofos, células basófilas, que constituem 15% a 20% das células da hipófise anterior humana normal.⁷⁴ Estas localizam-se na eminência média, junto à *pars nervosa* e ainda, escassamente, na região humana homóloga ao lobo intermédio (região anterior e mediana da glândula). Os seus grânulos têm cerca de 360 nm de diâmetro. Em situações de excesso de glicocorticóides, os corticotrofos sofrem um processo de desgranulação e hialinização microtubular designado de degenerescência hialina de Crooke. As células são caracteristicamente basófilas e PAS-positivas devido ao elevado conteúdo glicoproteico decorrente do glicopeptídeo N-terminal da pró-opiomelanocortina e da imunopositividade para a ACTH. Durante o desenvolvimento embrionário os corticotrofos são as primeiras células a diferenciar-se. O factor de transcrição Tbx19/T-pit é essencial para a sua diferenciação; mutações deste factor estão associadas a défice isolado da ACTH nos humanos.⁹⁶ A ACTH, para além de estimular a esteroidogénese supra-renal, também é essencial à manutenção das dimensões e estrutura normais da glândula.⁹⁷

A ACTH resulta de um processo de clivagem enzimática de um peptídeo precursor de 266 aminoácidos, a pró-opiomelanocortina. Este é codificado por um gene localizado no cromossoma 2p23.3 de 8 kb. Deste gene derivam seis hormonas: ACTH, β -lipotrofina (β -LPH), α -MSH, β -MSH, endorfina, e um glicopeptídeo N-terminal. A ACTH e a β -LPH derivam de um peptídeo precursor. Cada uma destas inclui diversos pequenos peptídeos, com distintas acções biológicas: α -melanotrofina (α -MSH) e o peptídeo do lobo intermédio semelhante à corticotrofina (CLIP) da ACTH; a γ -LPH e a β -endorfina da β -LPH. Por sua vez a β -MSH está contida na γ -LPH.

O promotor da POMC tem diversos factores reguladores de transcrição, nomeadamente, os *corticotroph upstream transcription element-binding proteins* (CUTE). Estes incluem NeuroD1, Ptx1 e Pit-1, que actuam sinergicamente. A convertase da prohormona (PC) 1/3 e PC2 processam a POMC em ACTH e MSH, respectivamente.⁹⁸ A transcrição do gene *POMC* nos corticotrofos é regulada positivamente pela CRH, via proteínas G, com activação da adenil ciclase, aumento do AMPc e estimulação da cinase da proteína A,⁹⁹ e negativamente pelos glicocorticóides.^{97,100} O factor inibidor da leucemia (LIF), citocina pró-inflamatória expressa nos corticotrofos, também parece estimular a transcrição do gene *POMC*, podendo desta forma estabelecer-se uma interface entre o sistema imunitário e a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal.¹⁰⁰ A vasopressina (VP), através do seu

receptor V1b, e a ocitocina também podem estimular directamente a libertação de ACTH embora seja um estímulo fraco. No entanto, ao actuar sinergicamente com a CRH podem potenciar o seu efeito.⁹⁷ Outros factores adicionais que podem regular a transcrição do gene *POMC* são a dopamina, serotonina, catecolaminas e citocinas como o já mencionado exemplo do LIF.^{103,100}

Os glicocorticóides inibem a expressão da *POMC* nos corticotrofos, assim como a secreção de CRH e de vasopressina no hipotálamo, levando à inibição da secreção de ACTH.^{97,101} Este retrocontrolo negativo pode ser classificado de acordo com o tempo de instalação em: rápido (30 minutos após a administração de glicocorticóides), intermédio (minutos a horas) e longo (horas a dias). Os dois primeiros ocorrem em condições fisiológicas, como por exemplo em situações de stresse moderado, e envolvem a inibição da secreção estimulada da ACTH. O retrocontrolo longo, afecta a secreção basal e estimulada da ACTH, e ocorre após exposição crónica aos glicocorticóides (como são exemplo a síndrome de Cushing ou a administração prolongada de corticoesteróides exógenos).^{97,101}

Os glicocorticóides exercem a sua função através da ligação a dois tipos de receptores: os dos glicocorticóides (GR) e os dos mineralocorticóides (MR).¹⁰² Os receptores dos glicocorticóides estão dispersos largamente nos tecidos periféricos e no cérebro, incluindo o hipotálamo e a hipófise. Os receptores dos mineralocorticóides estão habitualmente expressos nos tecidos periféricos, como no rim, e mais restritamente em algumas áreas do cérebro. As acções de retrocontrolo negativo dos glicocorticóides sobre o eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal envolvem a sua ligação aos receptores dos glicocorticóides, essencialmente a nível da hipófise e do hipotálamo, e aos receptores dos mineralocorticóides, a nível de algumas áreas cerebrais como é exemplo o hipocampo. Embora, no estado basal do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal, o retrocontrolo dos glicocorticóides seja mediado pelos receptores mineralocorticóides e glicocorticóides, na secreção estimulada da ACTH este retrocontrolo apenas se deve à ligação daqueles aos receptores dos glicocorticóides nos corticotrofos hipofisários e aos neurónios hipotalâmicos produtores de CRH.^{97,102}

Ritmicidade circadiana: no ser humano, os níveis de ACTH e de glicocorticóides evidenciam um ritmo circadiano, ocorrendo o pico de secreção durante a madrugada e os níveis mais baixos pelas 24 horas.¹⁰³ Este ritmo é gerado nos núcleos supraquiasmáticos, que enviam aferentes neuronais para os núcleos paraventriculares do hipotálamo, regulando a expressão da CRH. É a amplitude, e não tanto o número de pulsos da ACTH, que regula os níveis de glicocorticóides; assim sendo a amplitude dos pulsos de ACTH é muito superior durante os picos de secreção de cortisol. O retrocontrolo dos glicocorticóides é também essencial ao controlo do ritmo circadiano^{97,103} sendo mediado pelas acções nos receptores glicocorticóides e mineralocorticóides.⁹⁷

Gonadotrofos e regulação das gonadotrofinas (FSH e LH)

As hormonas foliculoestimulante e luteinizante são sintetizadas, armazenadas e segregadas pelos gonadotrofos. A regulação da função gonadal, no homem e na mulher, está dependente do controlo hipotalâmico e hipofisário através de mecanismos de retrocontrolo positivos e negativos. Esta regulação é complexa e só nos últimos anos tem sido melhor compreendida. Mecanismos endócrinos, autócrinos e parácrinos estão envolvidos, e os reguladores incluem hormonas (hipotalâmicas e hipofisárias), neurotransmissores, opióides endógenos e hormonas esteróides e não esteróides das gónadas.⁵¹ Os gonadotrofos constituem 7% a 15% das células da hipófise anterior e localizam-se nas regiões laterais;¹¹⁴ têm uma coloração basófila e os seus grânulos de secreção têm cerca de 200 nm de diâmetro. A FSH e LH são codificadas por dois loci, um da subunidade- α , comum à TSH e hCG no cromossoma 6p12-q21, e o outro da subunidade- β que confere a especificidade às hormonas, β -FSH no 11p13 e β -LH no 19q13.32. A FSH e LH são glicoproteínas sintetizadas e libertadas de forma pulsátil em resposta à pulsatilidade da GnRH. O padrão de secreção está dependente da frequência de pulsos da GnRH. Adicionalmente, cada pulso de GnRH potencia a resposta hipofisária aos pulsos subsequentes, levando a um aumento progressivo da secreção de LH que por sua vez é ainda potenciada pelo estradiol, mecanismo este essencial ao pico de LH a meio do ciclo menstrual na mulher.⁵¹

Os neurónios produtores de gonadoliberina (GnRH) têm origem na área olfactiva e migram, durante a embriogénese, para os núcleos arcuatos hipotalâmicos.⁷⁴ A gonadoliberina é composta por duas formas, a GnRH I e GnRH II.^{104,105} A GnRH I, de 10 aminoácidos, tem funções na estimulação da síntese e libertação da FSH e LH pelos gonadotrofos; a GnRH II, que difere em 3 aminoácidos, parece ter um papel no comportamento sexual, embora a sua função fisiológica exacta ainda não seja conhecida.^{106,107,108} A GnRH (designação corrente para GnRH 1) é libertada de forma pulsátil o que é essencial à manutenção de uma síntese e secreção normais das gonadotrofinas.¹⁰⁹ A designação de *gerador de pulsos de GnRH* é usada para representar esta capacidade intrínseca de secreção coordenada pulsátil. A frequência dos pulsos de GnRH é um factor crucial que determina a síntese e secreção da LH e da FSH sendo diferente para cada uma delas. Para a primeira é sensivelmente horária, tem intervalo de três a quatro horas.¹¹⁰ Acresce que o padrão de frequência dos pulsos é essencial à transcrição diferencial dos genes codificadores das subunidades α e β .^{111,112} Os mecanismos que levam à diferente activação da transcrição dos genes das subunidades- β na sequência da diferente frequência de pulsos, não foram ainda identificados e envolverão diferentes vias de sinalização celular.¹¹³

Reguladores centrais da GnRH: diversos sistemas de neurotransmissores e peptídeos, de diferentes regiões do cérebro, convergem para os neurónios da GnRH. Estes sistemas incluem neurónios que contêm: noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina, ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato, peptídeos opióides endógenos, NPY, e galanina.

Habitualmente as catecolaminas estimulam a secreção de GnRH e os peptídeos opióides e a prolactina inibem-na.¹¹⁴ As hormonas esteróides sexuais são também importantes reguladores da GnRH e gonadotrofinas.

Recentemente, uma nova família de peptídeos, as *kisspeptinas*, foram identificadas como grandes estimuladores da libertação de gonadotrofinas mediada pela GnRH.¹¹⁵ São ligandos das proteínas G e a sua sinalização pode ter um papel importante no desencadear da puberdade. Estudos recentes também indicam que esta via de sinalização celular pode mediar os retrocontrolos positivo e negativo induzidos pelos esteróides sexuais.¹¹⁵ As *kisspeptinas*, e o seu receptor *gpr-54*, foram pela primeira vez descritos como reguladores do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em 2003, quando dois grupos demonstraram que mutações no *gpr-54* levavam a um hipogonadismo hipogonadotrófico, e consequente atraso ou ausência da puberdade.¹¹⁶ As *kisspeptinas* são codificadas pelo gene *KISS-1*, descoberto por Lee *et al.*, e inicialmente considerado como um gene de supressão tumoral existente em metástases de melanomas malignos.¹¹⁷ O seu nome deriva dos conhecidos chocolates *Hershey's kisses*, uma vez que foi descoberto em Hershey, na Pensilvânia.¹¹⁶ Está localizado no cromossoma 1q32 e dá origem a um peptídeo precursor de 145 (kp-145) aminoácidos.¹¹⁸ Este precursor é clivado para 54 aminoácidos, e posteriormente para três fragmentos truncados, de 14 (kp-14), 13 (kp-13) e 10 (kp-10) aminoácidos. Estes peptídeos são colectivamente designados de *kisspeptinas* e estão altamente conservados nos mamíferos^{119,120} e vertebrados não mamíferos^{121,122,123} o que sugere o seu importante papel em uma grande variedade de vertebrados. As *kisspeptinas* são ligandos naturais dos receptores acoplados às proteínas G órfãs (GPCR), conhecidos como *gpr-54* no rato e AXOR12 no humano. O *gpr-54* é um receptor de 396 aminoácidos relacionado com os receptores da galanina, tendo com estes uma homologia de 45%; no entanto, tem fraca afinidade para a galanina. O receptor acoplado às proteínas G leva a activação da fosfolipase C, hidroxilação na membrana celular do fosfatidil bifosfato para diacil glicerol e consequente activação da proteína cinase C e do inositol trifosfato, e mobilização do cálcio intracelular.¹¹⁶ Embora fossem inicialmente relacionadas com as metástases de neoplasias malignas, foram posteriormente associadas a elementos cruciais do controlo do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal através da regulação da secreção de GnRH.^{124,125,126,127} Estudos de localização imunohistoquímica e do ARNm do receptor e do ligando, no cérebro e tecidos periféricos, demonstraram o *gpr-54* e *kiss-1* no hipotálamo, cérebro, medula espinhal, hipófise, ovário, próstata e placenta. Estas localizações sugerem a possibilidade de serem reguladoras do eixo reprodutor a diferentes níveis.^{119,120,128,129} A descoberta das *kisspeptinas* como reguladoras *major* da reprodução contribuiu para o avanço na percepção da complexidade da neuroendocrinologia na sua regulação, central, periférica e exógena.¹¹⁶ A acção da GnRH nos gonadotrofos é iniciada pela sua ligação aos seus receptores transmembranares levando à estimulação da síntese e secreção das gonadotrofinas. A GnRH é o principal regulador das concentrações dos seus receptores, que aumentam quando está aumentada.^{130,131} Esta capacidade é designada de sobre-regulação, e apenas ocorre em condições de pulsatilidade fisiológica da GnRH. Se a exposição à GnRH for contínua ocorre o contrário, isto é, uma sub-regulação, ou seja uma dessensibilização dos receptores.¹¹⁴

Regulação intra-hipofisária das gonadotrofinas: para além da GnRH e das hormonas esteróides sexuais, as inibinas, activinas, e folistatina são importantes reguladores da síntese e secreção das gonadotrofinas.¹³² Todas as três foram inicialmente isoladas nas gónadas, mas actualmente é conhecida a sua distribuição alargada a outros tecidos, incluindo os gonadotrofos hipofisários.^{132,133,134} Quer as inibinas quer as activinas são membros da família dos factores de transformação do crescimento-beta (TGF- β).^{134,135,136} As inibinas são dímeros de uma subunidade- α e uma de duas subunidade- β : β_A (inibina A) e β_B (inibina B). As activinas são homodímeros de subunidades- β_A e β_B , activina A (β_A, β_A) e activina B (β_B, β_B).¹³⁷ A folistatina é uma proteína de ligação das activinas que neutraliza e, por conseguinte, modula as suas acções.¹³⁸ É considerado que as inibinas actuam mais de forma endócrina para a regulação da libertação da FSH e as activinas e folistatina terão uma acção mais de natureza autocrínica ou paracrínica.^{132,135} A activina e folistatina sintetizadas a nível hipofisário, são importantes reguladoras fisiológicas da produção de FSH.^{132,135} A activina é um potente estimulador da FSH *in vivo* e *in vitro*.^{139,140} A folistatina, uma proteína de ligação da activinas,¹⁴¹ interfere com a ligação destas ao seu receptor, inibindo por consequência as suas acções.¹⁴² Pulsos frequentes da GnRH estimulam o ARNm da folistatina e consequentemente a inibição das activinas e diminuição da síntese de FSH. Pulsos lentos de GnRH têm um efeito oposto.^{143,144} Adicionalmente à folistatina, as inibinas antagonizam a estimulação da síntese de FSH pelas activinas ao interferir com a ligação destas aos seus receptores.¹³⁵ As subunidades inibina e activina, os receptores da activina, e folistatina são todos sintetizados a nível hipofisário, suportando o modelo de regulação autócrino e parácrino.^{132,135}

Retrocontrolo pelos esteróides sexuais: as hormonas esteróides sexuais são importantes reguladores da GnRH e das gonadotrofinas, através do retrocontrolo clássico a nível hipofisário e hipotalâmico. No hipotálamo, o estradiol, progesterona e testosterona inibem a pulsatilidade da GnRH.⁷⁴ As *kisspeptinas* podem também estar implicadas, uma vez que os neurónios que as libertam, a nível hipotalâmico possuem receptores para os esteróides sexuais. Acções destes podem passar pela alteração da expressão do gene das *kisspeptinas* e consequentemente da GnRH.¹¹⁵ A nível hipofisário o retrocontrolo mais importante é o do estradiol. Este é o único, entre os esteróides sexuais, com capacidade para exercer acções positivas e negativas tanto a nível hipotalâmico como hipofisário. A capacidade de retrocontrolo positivo é essencial para desencadear o pico de LH a meio do ciclo menstrual na mulher.¹¹⁴

Inibinas: as inibinas, sintetizadas e segregadas nas gónadas, são um importante factor adicional de regulação da biossíntese e secreção da FSH, inibindo-a quer no sexo feminino quer no masculino.^{132,135} O mecanismo mais provável envolve a interacção com um co-receptor da inibina, o betaglicano (receptor TGF- β tipo III).^{145,146} Esta interacção interfere com a ligação das activinas ao seu receptor, e portanto antagoniza as acções destas. Na mulher, as inibinas A e B são importantes reguladores da FSH, e cada uma tem distintas funções reguladoras. A inibina A tem um pico durante a fase média luteínica e por isso inibe a secreção da FSH nesta fase do ciclo menstrual.^{114,132} Pelo contrário, o pico da

inibina B ocorre na fase média folicular, actuando sinergicamente com o estradiol de forma a reduzir os níveis de FSH na fase folicular tardia. No homem, a inibina B é a principal forma circulante das inibinas.¹⁴⁷ É sintetizada no testículo predominantemente nas células de Sertoli, e é regulada pela espermatogénese.¹³² Os níveis de inibina B diminuem com a supressão da espermatogénese e aumentam com a estimulação da espermatogénese.^{132,148,149}

Hipotálamo e neuroendocrinologia

O hipotálamo, para além da sua importante função endócrina, está envolvido em múltiplas funções 'não endócrinas', como a regulação da temperatura corporal e a ingestão alimentar. É ainda o principal centro da regulação emocional e do comportamento sexual, estando conectado com muitas outras áreas do sistema nervoso. O próprio cérebro é influenciado por efeitos das hormonas quer directamente quer indirectamente. A função hipotalâmica é regulada tanto por sinais mediados por hormonas (exemplo dos retrocontrolos) como por aferências neuronais a partir de uma ampla variedade de origens. O hipotálamo pode ser considerado como um centro final comum, onde sinais com origem em múltiplos sistemas são integrados e processados para a hipófise anterior. Por exemplo, as interleucinas que desempenham um papel importante na resposta à infecção, também estão envolvidas na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal. Este processo, de interacção imunoendócrina, é importante na resposta do organismo a uma variedade de stresses. Por outro lado o hipotálamo também envia sinais para outras regiões do sistema nervoso. Por exemplo, enquanto as principais terminações nervosas dos neurónios magnocelulares, contendo vasopressina e ocitocina, terminam na hipófise posterior, as fibras nervosas com origem nos núcleos paraventriculares e supra-ópticos projectam-se para muitas outras regiões do sistema nervoso. No entanto também existem neurónios vasopressinérgicos no tronco cerebral envolvidos na regulação autonómica da pressão arterial, e na substância cinzenta, implicados nas funções corticais mais elevadas.³ Poder-se-á assim afirmar, que virtualmente, qualquer órgão ou tecido é afectado, directa ou indirectamente, por esta unidade hipotálamo-hipofisária.

Glândula pineal

A glândula pineal é um das estruturas cuja função tem gerado mais controvérsias e especulações ao longo da história. A sua localização anatómica no centro do sistema nervoso central, o seu carácter impar em torno de estruturas pares e o seu aspecto morfológico, atraíram a atenção de numerosos cientistas. Foram-lhe atribuindo propriedades relacionadas com o funcionamento do corpo humano e inclusive, com a espiritualidade.^{150,151} Foi considerada, durante longo período da história, como um órgão enigmático. Segundo as tradições mais antigas hindus, o ser humano teria um 'terceiro olho' ou órgão místico (a glândula pineal), que lhe proporcionaria uma espécie de janela à

sua própria vida espiritual e que encerraria a chave do poder mental. Curiosamente, este vortex de energia encontrar-se-ia activo durante as horas nocturnas, coincidindo com o que hoje está cientificamente definido ao funcionamento deste órgão. Este papel mediador da pineal entre o mundo material e espiritual alcançou a sua maior relevância no século XVII, quando o filósofo francês, René Descartes, a considerou como a 'sede da alma'.^{150,151} Esta dicotomia de conceitos entre a espiritualidade e o corpo físico foi sendo alvo de diversos debates científicos e filosóficos, ao longo dos séculos e que se tem mantido até à actualidade. António Damásio no seu livro 'O Erro de Descartes', considerou contudo a mente como indissociável do corpo, representado pelas estruturas nervosas ou sistema nervoso central.¹⁵² Parte do motivo desta constante discussão sobre os conceitos 'corpo, mente e alma', advém do aumento da dependência da tecnologia e de uma perda de humanização da medicina, tornando-a uma prática redutora e não holística. A procura da alma, poderá assim ser interpretada, como o restituir dessa humanização.¹⁵³

Independentemente destes aspectos filosóficos, a partir do século XX, a pineal passou a ser considerada como um 'transdutor neuroendócrino', transformando a informação luminosa procedente da retina em uma resposta endócrina, através da produção de melatonina, actuando como um potente neurotransmissor no sistema nervoso central.¹⁵¹

A glândula pineal localiza-se no tecto da zona posterior do terceiro ventrículo e é composta por dois tipos de células, os pinealócitos e as células intersticiais (semelhantes às da glia); é altamente vascularizada e a sua inervação principal é a simpática, com origem no gânglio cervical superior. A inervação parassimpática e a acção de neuropeptídeos hipotalâmicos também parecem estar envolvidas. Segrega sobretudo melatonina, um indol sintetizado a partir da serotonina por 5-metoxilação e N-acetilação, para a circulação sistémica e líquido cefalorraquídeo, sendo regulada pelo sistema nervoso simpático, com aumento em resposta à hipoglicemia e à escuridão. A pineal também segrega outros peptídeos e aminas bioactivas, incluindo TRH, somatostatina, GnRH e noradrenalina. No entanto, os seus papéis fisiológicos ainda não foram totalmente elucidados, parecendo envolver a regulação da função e do desenvolvimento das gónadas e dos ritmos cronobiológicos.³

A vida na terra tem evoluído com variações regulares diárias de disponibilidade de energia solar directa diurna alternando com períodos de escuridão nocturna. Praticamente todas as formas de vida neste planeta têm este padrão circadiano, na sua biologia, de forma a assegurar a coordenação temporal com o ambiente externo, uma tarefa essencial para a sua sobrevivência individual e da sua espécie. A interferência experimental com a função do relógio circadiano está relacionada com um aumento da taxa de crescimento do cancro. Por outro lado a disrupção circadiana clínica está também associada a uma incidência mais elevada de cancro, a uma progressão mais rápida deste, e a uma sobrevivência menor do doente. Os doentes com alterações dos ritmos cronobiológicos sofrem de maior ansiedade e depressão, de um sono mais curto, de maior fadiga diurna, e de uma menor qualidade de vida do que os doentes comparáveis que mantêm uma boa integração circadiana.¹⁵⁴ Poder-se-á assim inferir que a glândula pineal está muito longe de ser uma estrutura inerte podendo desempenhar importantes funções, mesmo no campo da formação tumoral.

2. Tumores da hipófise: nota introdutória

2.1. Conceito e Epidemiologia

Na região da glândula hipofisária ocorrem um conjunto diverso de patologias, nomeadamente os tumores da hipófise, e outras decorrentes das estruturas anatómicas adjacentes como células do sistema nervoso central, vasos sanguíneos, nervos e meninges. Os tumores da hipófise condicionam uma grande variedade de doenças endócrinas pelo que se torna importante o conhecimento dos seus aspectos fisiopatológicos, clínicos, de diagnóstico, de tratamento e de prognóstico.

Os tumores da hipófise são compostos por células da hipófise anterior e na sua quase totalidade, são benignos. Embora habitualmente tenham como localização a sela turca, podem ocorrer ectopicamente; exibem um vasto espectro de comportamento hormonal e de proliferação ou de invasão.¹⁶⁹ São o terceiro tipo mais comum de neoplasias intracranianas, representando aproximadamente 10% a 25% do seu total.¹⁵⁵

Actualmente a sua incidência calculada é de cerca de 15 a 20 casos por milhão e por ano (1,5 a 2:100.000), e a prevalência de cerca de um para 1.000 na população em geral.^{2,156} A prevalência está dependente do método de investigação utilizado. Em estudos *in vivo* representam aproximadamente 10% a 15% dos tumores intracranianos clinicamente diagnosticados, em estudos de autópsias cerca de 20% a 25%, e em estudos radiológicos podem chegar até cerca de 40%.

A prevalência baseada em cálculos retrospectivos era de 20 casos por 100.000 (1:5.000) mas foi questionada por um estudo mais recente, de 2006, decorrido na Bélgica que encontrou uma prevalência de 94 por 100.000 (1:1.064).¹⁵⁷ Na verdade foram realizados muito poucos estudos populacionais de epidemiologia dos tumores da hipófise. Os dados de hospitais terciários podem ser falaciosos dada a dificuldade em definir exactamente qual a população abrangida. Em 1999, Clayton publicou um estudo sobre a prevalência destes tumores na área de Stoke-on-Trent, no Reino Unido, com uma população, à data, de cerca de um milhão de habitantes tendo tido como resultado uma prevalência de 190 a 280 casos por milhão (1:3.571 a 1:5.263), dos quais 31,6%-35,7% eram prolactinomas, 32,1%-36,8% tumores clinicamente não funcionantes, 21,1%-21,4% somatotrofinomas e 10,5%-10,7% corticotrofinomas.¹⁵⁸ Em Itália, no início dos anos 90, foram publicados resultados com uma prevalência ainda inferior ao observado no Reino Unido.¹⁵⁹ Com estes estudos foi-se assumindo aquela prevalência como a possivelmente verdadeira. Em 2006, no estudo anteriormente mencionado e publicado por Daly *et al.*, foi realizado um trabalho na província de Liège com uma população total de 71.972 indivíduos recorrendo aos médicos de medicina geral e familiar e a todos os especialistas relevantes nesta matéria (endocrinologistas, neurocirurgiões, ginecologistas, etc.). Encontraram assim uma prevalência muito superior, a já referida de 94 casos por 100.000 ou 1:1.064. Os tumores mais frequentes foram os prolactinomas 66,2%, seguindo-se os tumores clinicamente não funcionantes 14,7%, os somatotrofinomas 13,2% e os corticotrofinomas 5,9%.¹⁵⁷ A

prevalência encontrada foi assim 3 a 5 vezes superior ao anteriormente considerado. Mais recentemente Daly *et al.* completaram um estudo internacional e multicêntrico de avaliação da prevalência destes tumores na Europa, América do Sul e outros locais, abrangendo uma população total de 862.000 indivíduos. Os resultados preliminares sugerem uma prevalência de tumores da hipófise clinicamente relevantes de 1:1.388 (intervalo 1:909-1:1.818), semelhante aos resultados da província de Liège.² Recentemente foram também publicados dois importantes estudos que vieram corroborar os resultados de Liège, um no Reino Unido¹⁶⁰ e outro na Finlândia.¹⁶¹ Em Banbury, Reino Unido, a prevalência foi de 77,6 casos por 100.000 habitantes (1:1.289), aproximadamente quatro vezes superior ao anteriormente pensado; estes dados estão de acordo com os da província de Liège. Embora esta prevalência aumentada dos tumores da hipófise em Liège, Bélgica e em Bandury, Reino Unido, seja de cerca de quatro vezes superior ao anteriormente estimado, na verdade pode ainda estar subestimada. Quanto à sua incidência recentemente foi encontrada na Finlândia também uma incidência superior ao anteriormente referido, de 4:100.000 habitantes, com um máximo de 6,7:100.000 no grupo dos 30 aos 39 anos.¹⁶¹ Apesar do aperfeiçoamento do diagnóstico bioquímico e imagiológico alguns tumores, macroadenomas, mesmo com alguma sintomatologia continuarão a não ser diagnosticados, particularmente nos doentes mais idosos.¹⁶² Concluindo e globalmente, os estudos mais recentes mostram que os tumores da hipófise clinicamente relevantes são cerca de 3 a 5 vezes mais frequentes do que o anteriormente referido, o que é mais um argumento a favor da necessidade de um maior envolvimento no diagnóstico destes tumores bem como na investigação da sua etiologia.² O aumento da incidência e prevalência resultam possivelmente de um conjunto de factores, nomeadamente, o aumento real da sua incidência, a maior acuidade de diagnóstico, a maior longevidade da população e a melhoria dos cuidados de saúde. Apesar de só muito raramente se tratarem de carcinomas, podem condicionar significativa morbilidade e eventualmente mortalidade; embora classificados como benignos, podem ser altamente invasivos e letais, quer devido à infiltração das estruturas locais quer devido às complicações dos efeitos sistémicos condicionados pelas síndromes endócrinas que podem causar. Como já referido, só casos excepcionais desenvolvem metástases, quer para o sistema nervoso central, quer para os gânglios linfáticos e órgãos distantes permitindo a classificação de carcinoma.⁴⁵

No que diz respeito ao fenótipo poder-se-á considerar que aproximadamente 50% dos tumores são prolactinomas, 30% tumores clinicamente não funcionantes, 15% a 20% somatotrofinomas, 5% a 10% corticotrofinomas e menos de 1% tirotrofinomas.¹⁶³ Apesar de os gonadotrofinomas com síndrome clínica hormonal serem raros, representam a maioria, senão quase a totalidade dos tumores clinicamente não funcionantes. Os carcinomas da hipófise representam cerca de 0,2%,¹⁵⁵ (distinguindo-se de cerca de 1% das lesões metastáticas de outros tumores para a hipófise);¹⁶⁴ podem ocorrer em qualquer idade e não há predilecção por género. A maioria é funcionante com uma maior proporção de secretores de ACTH e de prolactina comparativamente com os outros tumores.⁴⁵

Embora grande parte destas lesões sejam consideradas achados incidentais também é certo que muitas têm um impacto importante mas frequentemente não identificado na

fertilidade, na longevidade e na qualidade de vida dos doentes pelo que a sua importância clínica tem sido cada vez mais reconhecida,¹⁶⁵ e particularmente porque a maioria dos doentes é afectada durante a idade de maior produtividade (idade média de 37 anos, no Reino Unido e de 40 anos na Bélgica). O aperfeiçoamento da metodologia dos doseamentos hormonais, actualmente ultra sensíveis e de grande especificidade, e dos estudos imagiológicos vieram permitir detectar alterações subtis hormonais bem como pequenas lesões hipofisárias. As grandes transformações e inovações nos tratamentos destes tumores, nomeadamente no desenvolvimento de fármacos, aperfeiçoamento de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas e na melhoria das técnicas de radioterapia contribuiram igualmente para melhorar o prognóstico e a qualidade de vida destes doentes.¹⁶⁵

2.2. Classificação

Os tumores da hipófise podem ser classificados de uma forma muito diversificada e complementar de acordo com critérios de produção hormonal (*classificação funcional ou fenótipo clínico*), com critérios anatómicos e radiológicos (*classificação anatómica e radiológica*) e com critérios histoquímicos e moleculares, de acordo com a célula de origem da expansão clonal (*classificação anátomo-patológica que inclui o fenótipo imunológico e genótipo*).^{166,167} A actividade endócrina permite determinar: a síntese hormonal (*genótipo*), o armazenamento hormonal (*fenótipo imunológico*) e a libertação hormonal (*fenótipo clínico*). O genótipo é determinado por técnicas de genética molecular que permitem identificar o ADN e ARNm nas células tumorais e determinar a linha celular de origem. A sua complexidade leva a que este tipo de classificação tem sido mais dirigido à investigação e não tanto à clínica, embora seja a que tem maior acuidade de diagnóstico. O fenótipo imunológico é determinado pelas propriedades imunocolorimétricas das células utilizando anticorpos especificamente dirigidos a cada uma delas e aos compostos hormonais. O fenótipo clínico é o mais grosseiro no que diz respeito à origem do tumor, mas tem a vantagem de permitir uma classificação clínica de fácil aplicação. Associadamente deverá estar presente a classificação anatómica uma vez que são complementares.¹⁶⁶

A *classificação funcional* está relacionada com a expressão hormonal podendo os tumores serem classificados como clinicamente funcionantes (hormonalmente activos) e clinicamente não funcionantes (hormonalmente inactivos). Nestes casos pode haver uma secreção hormonal reduzida, uma secreção de peptídeos biologicamente inactivos ou realmente ausência de secreção hormonal. Aproximadamente dois terços dos tumores diagnosticados são funcionantes.¹⁶⁵ Entre estes existem os secretores de ACTH, associados à doença de Cushing e à síndrome de Nelson; os secretores de GH com a acromegalia e o gigantismo; os de prolactina com disfunção gonadal e galactorreia; os de TSH com disfunção tiroideia; e os raros, secretores de gonadotrofinas clinicamente detectáveis, com

hipogonadismo (por sub-regulação paradoxal da função) ou mais excepcionalmente com hiperestimulação gonadal.

As *classificações anatómica e radiológica* baseiam-se na dimensão e no grau de invasão. Sob o ponto de vista dimensional classificam-se em microadenomas ($\leq 1\text{cm}$) e macroadenomas ($>1\text{cm}$)¹⁶⁷ e entre estes há ainda os designados, por alguns autores, de gigantes ($>4\text{cm}$).¹⁶⁸ No que diz respeito à sua extensão e invasão a classificação usada habitualmente é a de Hardy (descrita nos anos 70 do século XX) adaptada (por introdução de algumas modificações resultantes da evolução dos meios imagiológicos de diagnóstico) que inclui quatro graus: grau I, microadenomas, lesões intra-hipofisárias com dimensões inferiores ou iguais a 10 mm de diâmetro e sem destruição da sela; grau II, tumores com dimensões superiores a 10 mm de diâmetro, intra-selares ou com extensão supra-selar, mas sem invasão (pode haver alargamento da sela sem que o tumor condicione erosão óssea); grau III, tumores de pequenas ou de grandes dimensões, localmente invasivos, podendo associar-se a alargamento difuso da sela e a extensão supra-selar; grau IV, tumores largamente invasivos que envolvem as estruturas peri-selares, incluindo osso, hipotálamo e seios cavernosos.¹⁶⁹

A *classificação anátomo-patológica* está dependente de critérios histológicos, imunohistoquímicos, de microscopia electrónica e moleculares, como já referido. A hipófise é composta pelo menos por seis tipos diferentes de células secretoras, sendo que cada célula é responsável pela produção e libertação de, pelo menos, uma hormona. Os estudos recentes de biologia molecular clarificaram *vias major* de citodiferenciação das células da adenohipófise, que são determinadas por um padrão complexo de expressão de factores de transcrição.^{169,170} Estes factores podem ajudar na classificação destes tumores.^{171,172,173,174,175} Diversos factores de transcrição foram identificados constituindo elementos chave na definição dos fenótipos específicos celulares e na regulação da expressão dos genes codificadores das respectivas hormonas. Os corticotrofos, as primeiras células da hipófise humana fetal a diferenciarem-se e a expressão do gene da pró-opiomelanocortina são regulados pelos factores de transcrição Tpit¹⁷⁶ que medeia a sua acção conjuntamente com o Ptx1 e neuroD1, como já anteriormente referido.^{177,178} A segunda linha de diferenciação celular na hipófise humana é determinada pelo Pit-1, proteína que activa os genes da GH, prolactina, e β -TSH.^{179,180,181,182,183,184} A expressão de receptores dos estrogénios, permite a expressão de prolactina e de GH em uma população celular bi-hormonal, os mamossomatotrofos.¹⁸⁵ O desenvolvimento dos lactotrofos maduros está dependente da presença de um repressor da expressão da GH, ainda desconhecido. Algumas das células que expressam Pit-1 também expressam o factor embrionário tirotrófico¹⁸⁶ e diferenciam-se em tirotrofos quando na presença do repressor da GH e do GATA-2.¹⁸⁷ Em condições fisiológicas, somatotrofos, mamossomatotrofos, e lactotrofos podem transdiferenciar-se de uma forma reversível.¹⁸⁸ Também se demonstrou em modelos animais, que os somatotrofos têm capacidade de se transdiferenciar em tirotrofos e que esta situação é igualmente reversível.¹⁸⁹ Estas alterações indicam a plasticidade destes quatro tipos celulares sendo todos dependentes do Pit-1. A terceira linha de diferenciação celular diz respeito aos gonadotrofos cuja produção hormonal está dependente do factor de esteroidogénese 1 e do GATA-2, na presença dos receptores de

estrogénios.^{175,187} Cada tipo de célula pode dar origem a tumores clinicamente funcionantes ou silenciosos. Alguns tumores têm variantes morfológicas, que possivelmente reflectem diferentes mecanismos patogénicos, podendo predizer diferentes respostas ao tratamento. Os funcionantes, e de acordo com a célula de origem, poder-se-ão dividir em prolactinomas, somatotrofinomas, corticotrofinomas, gonadotrofinomas, tirotrofinomas, tumores plurihormonais e ainda os designados de ‘tumores com diferenciação de translinhagem’, isto é, tumores com produção hormonal diferente da típica da célula de origem (como por exemplo corticotrofinomas com produção de GH, somatotrofinomas com produção de ACTH, gonadotrofinomas com produção de ACTH). Os clinicamente não funcionantes, incluem tumores silenciosos, tumores oncocíticos e os verdadeiramente não secretores. A maioria dos adenomas não funcionantes tem origem nos gonadotrofos, tendo a Classificação dos Tumores Endócrinos, da Organização Mundial de Saúde (OMS),¹⁶⁷ adoptado este conceito. Também segundo esta organização, só são considerados três tipos de lesões: adenomas hipofisários típicos, adenomas hipofisários atípicos (com índice de proliferação celular Ki-67 superior a 3%) e os carcinomas hipofisários (termo exclusivamente aplicado a casos com metastização cerebrospinal ou sistémica). Os carcinomas hipofisários são muito raros (0,2%) com células mais atípicas do que o habitual (Ki-67 habitualmente superior a 10% e p53 frequentemente positivo); estes tumores são frequentemente secretores, particularmente de ACTH e de prolactina. Finalmente embora de incidência muito rara, existem tipos especiais de tumores da hipófise, nomeadamente os tumores agressivos, os tumores ectópicos e os gangliocitomas. Os tumores da hipófise agressivos representam cerca de 15% dos tumores operados, caracterizando-se pela sua agressividade local e dificuldades no tratamento que decorrem da sua dimensão, invasibilidade, velocidade de crescimento e frequência elevada de recorrências.¹⁹⁰ Excepcionalmente os tumores da hipófise podem ocorrer ectopicamente sendo o seio esfenoidal a localização mais frequente. O estabelecimento deste diagnóstico depende de marcadores neuroendócrinos como a cromogranina A, a sinaptofisina e as hormonas da hipófise. Os gangliocitomas são tumores igualmente muito raros com uma diferenciação neuronal e endócrina.

A classificação histológica dos tumores da hipófise foi evoluindo ao longo do tempo com a evolução do conhecimento científico. No início do século XX, como descritos em 1912 por Harvey Cushing no livro *Pituitary body and its disorders*, eram classificados em acidófilos, basófilos e cromófilos de acordo com a sua coloração pela hematoxilina e eosina. Em 1956, Kernhoan e Sayre no seu atlas *Tumors of the Pituitary Gland and Infundibulum* debruçaram-se principalmente sobre os seus aspectos morfológicos dado não estarem ainda disponíveis a imunohistoquímica, o radioimunoensaio e a microscopia electrónica. Em 1986 Kalman Kovacs e Eva Horvath incorporaram novas informações e técnicas na classificação destes tumores. No seu fascículo *Tumors of the Pituitary Gland* verificaram uma correlação da estrutura do tumor com a sua actividade endócrina e vaticinaram que a classificação colorimétrica iria rapidamente cair em desuso o que, apesar de verdadeiro, ainda não se veio a verificar por completo. A classificação funcional e morfológica pode dar a célula de origem do tumor, o conteúdo hormonal, e determinar o tratamento. Em 1998 Sylvia Asa,¹⁹¹ bem como a classificação da OMS de 2004 por R DeLellis, RV Loyd, P

Heitz, e C Eng,¹⁶⁷ salientam a importância da informação clínico-patológica e imunohistoquímica na classificação dos tumores da hipófise, como está explicitada no quadro seguinte, constituindo actualmente a classificação com maior relevância.^{45,192}

Classificação dos tumores da hipófise (adaptada da OMS, 2004)

- Adenoma produtor de somatotrofina
 - Adenoma densamente granular
 - Adenoma escassamente granular
 - Adenoma misto
 - Mamossomatotrofinoma
 - Adenoma de células potenciais acidófilas
- Adenoma produtor de prolactina
 - Adenoma densamente granular
 - Adenoma escassamente granular
 - Adenoma de células potenciais acidófilas
- Adenoma produtor de tirotrofina
- Adenoma produtor de corticotrofina
 - Corticotrofinoma silencioso subtipo 1
 - Corticotrofinoma silencioso subtipo 2
- Adenoma produtor de gonadotrofinas
- Adenoma não classificado
 - Adenoma silencioso subtipo 3
 - Adenoma plurihormonal
 - Adenoma de células nulas ou adenoma hormonalmente imunonegativo
 - Oncocitoma
- Adenoma atípico
- Carcinoma
- Outro

2.3. Fisiopatologia: mecanismos moleculares e tróficos de indução da formação tumoral

A patogénese da formação tumoral na hipófise anterior tem sido intensamente estudada mas os mecanismos causais envolvidos na transformação das células hipofisárias e na génese tumoral permanecem obscuros.¹⁶⁴ O mecanismo molecular aberrante iniciador na grande maioria dos tumores esporádicos não é conhecido.¹⁹³ Pela análise clonal (que veio permitir fazer a importante distinção entre uma proliferação policlonal devida a factores estimuladores e uma expansão monoclonal devida a uma célula geneticamente aberrante) foi possível demonstrar que praticamente todos os tumores secretores e os não funcionantes são unicelulares na sua origem, por expansão monoclonal de uma célula geneticamente mutada.^{193,194,195} Mesmo apesar da sua natureza monoclonal, estes

tumores apresentam uma significativa diversidade e imprevisibilidade de comportamento biológico. Assim sendo, múltiplos esforços têm sido efectuados no sentido da avaliação dos factores de indução tumoral e da sua correlação com os estudos clínico-patológicos. Vários trabalhos têm vindo a demonstrar a sua multiplicidade, contudo, até ao momento, nenhum pode ser considerado como a causa de determinado tipo de tumor. Têm sido implicados eventos genéticos, de estimulação hormonal e factores de crescimento, sendo provável que todos interajam no início da transformação e na promoção da proliferação celular tumoral.⁴⁵ De facto, a tumorigénese hipofisária resulta de uma complexa inter-relação entre factores genéticos e humorais, que induzem alterações em diferentes vias de sinalização celular que ligam o meio extra celular ao núcleo e à possível regulação da formação tumoral.¹⁹⁶ Existe um número de eventos moleculares que aumenta a expressão de genes de transformação ou que silenciam genes de supressão tumoral. As alterações a nível genético provavelmente reflectem uma desregulação hormonal hipotalâmica e hipofisária com excesso de factores de crescimento. Uma visão abrangente das moléculas de sinalização envolvidas na tumorigénese hipofisária, foca-se em uma sinalização aberrante do AMPc como o primeiro evento na indução da formação do adenoma. O crescimento de um tumor monoclonal é iniciado ou assistido pela desregulação do ciclo celular. A influência de factores ambientais ou estímulos iatrogénicos mutagénicos podem ainda contribuir para a promoção do desenvolvimento do tumor. Globalmente poder-se-á dizer que os adenomas hipofisários benignos têm um elevado nível de diferenciação e que a iniciação e progressão tumorais implicam distorção das redes de sinalização. O microambiente intra-hipofisário contribui para a transformação através de diversas hormonas, factores de crescimento e citocinas.¹⁹⁶

A maioria dos tumores da hipófise são esporádicos, embora alguns casos mais raros se enquadrem em síndromes genéticas, como a síndrome de McCune-Albright, a neoplasia endócrina múltipla do tipo 1, o complexo de Carney e, mais recentemente, o fenótipo MEN1-like (MEN4) e as síndromes familiares de predisposição para tumores da hipófise (PAP). Alguns genes específicos foram identificados na predisposição para o desenvolvimento destes tumores (*GNAS*, *MEN1*, *PRKAR1A*, *CDKN1B* e *AIP*), mas estes raramente estão envolvidos na patogénese dos tumores esporádicos.¹⁶⁴

Mutações de genes de supressão tumoral ou de oncogenes, como o observado na maioria dos tumores malignos, não parecem desempenhar um papel importante na grande maioria dos tumores da hipófise. O gene de transformação tumoral hipofisário (*PTTG*, membro da família securina envolvida na separação das cromátides filhas) foi o primeiro gene a ser encontrado com expressão aumentada nas células hipofisárias tumorais. Diversos genes de supressão tumoral, particularmente os envolvidos na regulação do ciclo celular, estão sub-expressos, a maioria das vezes por modulação epigenética, geralmente por hipermetilação do promotor sendo que o regulador destas metilações coordenadas é ainda desconhecido. Alterações na sinalização celular têm sido encontradas mas desconhece-se a sua base molecular. Ambas as vias Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt/mTOR estão sobre-expressas e/ou hiperactivadas nos tumores da hipófise: estas vias partilham uma raiz comum, a activação inicial relacionada com o receptor da cinase da tirosina, levando

alguns autores a especular se uma modificação destes receptores, ou da sua relação com as proteínas da matriz da membrana celular, possam ser um evento precoce na tumorigénese hipofisária.¹⁶⁴

Os tumores da hipófise exibem um tão largo espectro de variabilidade de crescimento, de agressividade e de comportamento hormonal, que constituem, uma oportunidade única de investigação dos mecanismos patogénicos que estão na base deste processo neoplásico. Estes incluem alterações na regulação hormonal, na estimulação de factores de crescimento, no controlo do ciclo celular e nas interacções célula-estroma, tendo provavelmente por base mutações genéticas e disrupção epigenética. Volta-se a salientar que, até ao momento, nenhum factor isoladamente consegue explicar as diversas facetas do processo da génese tumoral hipofisária.¹⁹⁷

Genótipos de susceptibilidade e factores ambientais

O desenvolvimento dos tumores tem sido relacionado com a acumulação de múltiplas agressões genéticas que levam a um distúrbio progressivo do controlo do crescimento e da diferenciação celulares. A exposição a agentes externos (químicos, físicos e biológicos) genotóxicos contribui para a lesão genética e indução dos processos tumorais. Muitos destes processos são afectados, quer por factores individuais quer por factores ambientais. Por exemplo, embora seja conhecido que a carcinogénese é significativamente afectada por factores externos, a activação ou inactivação metabólicas de procarcinogénios podem modular este processo. O exemplo mais típico é o da relação do tabagismo com o cancro do pulmão; o tabagismo é a principal causa de cancro do pulmão, mas só uma minoria de fumadores o vem a desenvolver.¹⁹⁸ Capacidades metabólicas diferentes, geneticamente herdadas podem, de facto, ter um papel primordial na susceptibilidade individual a factores ambientais indutores de tumorigénese.^{199,200,201,202}

Existem polimorfismos genéticos nas enzimas da fase I (activadoras) e da fase II (inactivadoras) de biotransformação de xenobióticos. Seria então concebível que indivíduos com génotipos associados a uma activação enzimática mais eficiente ou inactivação enzimática menos eficiente, poderiam estar particularmente em risco, se expostos a genotóxicos.¹⁹⁸ As enzimas da fase I, citocromo P450 1A1 (CYPA1) e 2D6 (CYP2D6), foram as candidatas mais estudadas, como agentes modificadores da resposta individual ao meio ambiente. Entre estas, o gene codificador da CYP2D6 com os dois alelos deficientes [genótipo metabolizador lento (PM) existente em 7% dos caucasianos] pode traduzir-se num risco diminuído de cancro.^{199,200,201,202} Entre as enzimas da fase II, as glutationas S-tranferases (GSTs), temos os genes codificadores da GST M1 (*GSTM1*) e da GST T1 (*GSTT1*), que são polimórficos e em que uma deleção em homozigotia dos respectivos genes, designado o genótipo do tipo nulo, resulta na ausência de actividade da enzima.^{203,204} Aproximadamente 50% dos caucasianos têm o genótipo nulo *GSTM1*, o que os pode colocar em maior risco face a indutores ambientais de formação tumoral.^{205,206,207,208} O genótipo nulo *GSTT1*, que tem uma frequência de 15% a 25% na população caucasiana, também foi associado a alguns tumores cerebrais, síndromes

mielodisplásicas, e leucemias mielóides.^{209,210} Relativamente aos tumores da hipófise, apenas foi encontrado um efeito marginal, por Perret *et al.*, envolvendo os genes *GSTM1* e *CYP2D6*.²¹¹

O gene *AIP*, identificado em 2006 por Vierimaa *et al.*,²¹² poderá também ter um papel no metabolismo de agentes genotóxicos. O papel exacto do *AIP* nos diferentes tecidos não é claro. O que actualmente se sabe, é que o *AIP* codifica uma proteína que faz parte de um complexo multiproteico *chaperone* para o receptor aril hidrocarbono (AhR), que também contém a proteína de choque térmico 90 e o p23.²¹³ O receptor aril hidrocarbono é um ligando de activação de factores de transcrição, aos quais a dioxina e substâncias químicas semelhantes se ligam com elevada afinidade. Estas substâncias após a sua ligação ao AhR, sofrem translocação para o núcleo, onde levam à activação de genes de transcrição envolvidos no metabolismo xenobiótico. A ligação da dioxina ao AhR é um facto, contudo desconhece-se se esta ligação tem um papel na indução tumoral hipofisária.²¹⁴ Em 1995, em Seveso, Itália, ocorreu um acidente industrial em que uma pequena população foi exposta a dioxinas e posteriormente investigada a incidência de tumores da hipófise nas pessoas sujeitas a elevada, intermédia, baixa exposição e sem exposição, não se tendo observado diferenças significativas entre os grupos. Apesar de não ter sido identificado um aumento da incidência de tumores da hipófise nos indivíduos com maior exposição tal, não implica que seja inócua, motivo pelo qual são necessários mais estudos em áreas com esta exposição, e também seguimentos mais prolongados.²¹⁵ Atendendo ao elevado número e variabilidade na expressão de enzimas metabolizadoras de carcinogénios, e à complexidade de exposição aos químicos, não se poderá esperar que a avaliação de apenas um genótipo polimórfico seja suficiente para determinar a susceptibilidade individual aos agentes ambientais. Seria desejável o estabelecimento de um perfil alargado de risco. Nos tumores da hipófise os dados relativamente escassos a este propósito, levaram-nos a investigar esta área, que poderia eventualmente também contribuir para o esclarecimento do seu desenvolvimento e agressividade.

Relacionada com o ambiente, não se pode omitir uma outra área em estudo, que pode estar igualmente relacionada e contribuir para o desenvolvimento dos tumores da hipófise, a epigenética (investiga a informação contida no ADN, a qual é transmitida na divisão celular, mas que não constitui parte da sequência do ADN) e a epigenómica (estudo das modificações epigenéticas aplicadas a um campo mais vasto do que a um simples gene). Esta refere-se a um processo que influencia hereditariamente a expressão de um gene, sem contudo modificar a sequência do ADN. Enquanto que o genoma é o mesmo nas diversas células, o epigenoma é distinto em cada um dos diferentes tipos de células que formam o ser humano. O epigenoma (do grego, o que está acima do genoma) funciona como uma intersecção entre o genoma e o ambiente sendo o genoma modificado em pelo menos duas formas: por modificações químicas do próprio ADN, ou por modificações químicas das proteínas que estão associadas a ele, ambas levando quer a uma inactivação quer a uma activação de genes. A primeira, através da metilação do ADN, afecta directamente o ADN no seu genoma, pela ligação dos alvos químicos designados de grupos metil ao ADN, em locais específicos. Os grupos metil tornam os genes activos ou

inactivos, pela interferência na interacção entre o ADN e a maquinaria celular de síntese proteica. A segunda forma, designada de modificação das histonas (do alemão, significando 'de origem incerta'), afecta indirectamente o ADN no seu genoma. As histonas são proteínas à volta das quais o ADN se liga, formando os cromossomas no núcleo celular. Diversas moléculas e químicos se podem ligar a estas proteínas (ex. metilação ou acetilação) e alterar a forma como o ADN é armazenado ou enrolado, isto é, mais compactamente ou de forma mais laxa. Se o enrolamento for apertado, um gene poderá ficar 'escondido' da maquinaria proteica celular, e conseqüentemente funcionalmente inactivado. Se, pelo contrário, o enrolamento for mais laço, um gene que anteriormente poderia estar 'escondido' torna-se evidente e activo. Assim sendo, as histonas que inicialmente eram vistas somente como matriz para o enrolamento do material genético (ADN) formando a cromatina e o nucleossoma, passaram também a ser consideradas como tendo um papel regulador na expressão do ADN. A metilação do ADN é uma modificação epigenética 'chave' que nos mamíferos está restrita aos dinucleótidos CpG. Embora estes sejam relativamente pouco frequentes (aproximadamente 1 por 100 pb) ao longo do genoma, onde cerca de 80% são metilados, associam-se a uma frequência previsível (aproximadamente 1 por 10 pb) em sequências de repetição e em regiões designadas de 'ilhas de CpG', que frequentemente acompanham os locais de início da transcrição de genes.²¹⁶ Em condições normais, a maioria das ilhas CpG associadas às regiões promotoras permanecem não metiladas.²¹⁷ Contudo, existem excepções como a inactivação do cromossoma X na mulher, no *imprinting* de genes e em genes específicos de alguns tecidos, em ambos os géneros.²¹⁸ O silenciamento de genes de supressão tumoral, através ou associado à metilação de ilhas CpG, é reconhecido como um mecanismo *major* de inactivação de genes (frequentemente coexistente com lesões genéticas) na maioria dos cancros estudados até ao momento.²¹⁹ Uma associação entre ilhas metiladas CpG e a modificação das histonas também tem sido observada, podendo estas alterações levar ou ser consequência de alterações da cromatina. Estas modificações das histonas do núcleo, principalmente a metilação e a acetilação, são frequentemente referidas como o código das histonas.²²⁰ A relação de causa e efeito entre a metilação das ilhas CpG, modificação das histonas, remodelação da cromatina e silenciamento de eventos genéticos, não é ainda perfeitamente clara. Assim, enquanto os estudos iniciais favoreciam um modelo onde a metilação do ADN (ilhas CpG) favorecia o recrutamento de complexos de proteínas, que por sua vez levavam a modificação das histonas e condensação da estrutura da cromatina, o inverso também parece ser verdade.²²¹ Neste caso, a metilação das ilhas CpG pode resultar no reforço de um já estabelecido evento de silenciamento de genes, induzido por histonas. Concluindo: estes mecanismos epigenéticos, tais como a metilação do ADN, a modificação das histonas (metilação, acetilação, fosforilação, etc.) e os ARN de interferência (fragmentos curtos de ácido ribonucleico capazes de modificar a transcrição genética), e os seus efeitos na activação e inactivação dos genes, estão a ser cada vez melhor estudados e compreendidos, verificando-se que desempenham um importante papel não só na transmissão e desenvolvimento do fenótipo, como também na doença. A investigação do epigenoma dos tumores hipofisários está a tentar trazer uma outra dimensão para a compreensão das

alterações que caracterizam estes tumores. Globalmente, estes estudos demonstram que as alterações do epigenoma do tumor não são apenas um epifenómeno mas que têm consequências funcionais no contexto da sua evolução.²²²

Finalmente, refere-se ainda o eventual papel de factores indutores de stresse, com possível interferência no sistema imunológico e no desenvolvimento de tumores da hipófise. Segundo alguns autores, eventos marcantes negativos e privação paterna em idades precoces, estarão relacionados com o desenvolvimento de prolactinomas e mais recentemente, também de somatotrofinomas.^{223,224,225,226,227} Estas observações indicam que factores ambientais e de stresse emocional podem desempenhar um papel na expressão clínica de alguns tipos de tumores da hipófise. Nos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes, tal relação só foi observada no sexo feminino.^{227,228} Os mecanismos envolvidos não são conhecidos, permanecendo também por esclarecer qual a verdadeira relevância deste achado. No entanto, sabe-se que em condições de stresse são libertados neuropeptídeos que têm receptores a nível do sistema imunitário, que pode haver activação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal e estimulação da produção de prolactina e que eventos psico-somáticos também se podem associar a uma diminuição do tónus dopaminérgico,²²⁴ podendo assim contribuir como factores facilitadores da iniciação ou do agravamento da doença. Esta outra linha de investigação, a de tentar compreender melhor qual a relação entre a mente e a preservação da saúde ou o aparecimento de doença, é também muito aliciante.

Actividade trófica hipofisária

No modelo adulto de experimentação animal existe uma subpopulação de células da hipófise anterior, com as características de células germinais oligopotententes, que continuam a sofrer mitoses até a um estado estável na vida adulta.²²⁹ A divisão destas células parece ser, em grande parte, independente do meio hormonal circundante, sendo que a actividade mitótica parece diminuir progressivamente com a idade. A sua identidade, contudo, ainda permanece obscura.¹⁶³ Na ausência de qualquer alteração ambiental, fisiológica, ou stresse psicológico, a maioria das células filhas sofre apoptose precoce. Dados de diversos trabalhos sugerem que a proporção de células que escapa à apoptose, persiste como células progenitoras com expressão de receptores hormonais, mas hormonalmente inactivas, isto é, células precursoras 'nulas'.^{230,231} Sob circunstâncias hormonais diferentes podem sofrer apoptose ou divisão celular para células hormonalmente inactivas. No entanto mantêm ainda o poder de subsequentemente, se diferenciarem em células secretoras dos diferentes tipos.²³² Temos como exemplos a sua diferenciação em corticotrofos após adrenalectomia, gonadotrofos após gonadectomia ou uma pequena percentagem de tirotrofos após tiroidectomia.²³¹

Na hipófise normal a renovação das células progenitoras está sob o controlo tónico inibidor dos níveis fisiológicos circulantes de corticosterona, sendo que quando ausentes, motivam períodos de aumento da sua actividade mitótica. Os estrogénios levam a uma

estimulação dessa actividade, igualmente dependente dos níveis e do tempo de exposição. A renovação basal das células hipofisárias progenitoras também está dependente dos níveis das hormonas da tiróide mas possivelmente através dos níveis supra fisiológicos de TRH e não tanto pelo retrocontrolo das hormonas da tiróide. Estes podem induzir hiperplasia dos tirotrofos e lactotrofos. A GHRH parece exercer igualmente um efeito trófico mas a GnRH não parece induzir aumento das mitoses após gonadectomia. O aumento das mitoses dos corticotrofos deve-se essencialmente à redução do retrocontrolo negativo dos glicocorticóides e só escassamente aos níveis supra-fisiológicos de CRH que ocorrem, por exemplo, na supra-renalectomia bilateral.¹⁶³

Ao considerar estes aspectos tróficos há que ter em atenção o dimorfismo sexual, tanto estrutural como funcional, quer da hipófise normal quer dos adenomas da hipófise. Os microprolactinomas e os corticotrofinomas, por exemplo, são mais frequentes no sexo feminino e os macroprolactinomas no sexo masculino. Tem sido sugerido que a maior abundância de células multifuncionais na hipófise anterior na mulher, comparativamente à do homem, indica uma transdiferenciação, devido às oscilações hormonais que acontecem durante o ciclo gonadal,²³³ e que os estrogénios protegem os lactotrofos da morte celular induzida pela dopamina.²³⁴ Flutuações repetidas dos níveis de estrogénios, e possivelmente a manutenção de um estado elevado de impregnação estrogénica, parecem ser responsáveis por aquelas diferenças. No sexo masculino, níveis baixos de estrogénios podem levar a menor produção de prolactina e menor número de mitoses. Em resumo, a resposta mitótica hipofisária às variações do meio hormonal ocorre maioritariamente em células relativamente recém formadas a partir de células progenitoras hormonalmente 'nulas', originadas de uma reserva de células germinais oligopotententes activas (transdiferenciação) e não de uma proliferação *de novo* de células pré-existentes.¹⁶³

Fenótipos

Atendendo ao número de células distintas que fazem parte da hipófise normal não é de surpreender que os tumores da hipófise no humano expressem diferentes fenótipos, tróficos e de secreção.¹⁶³

Embora os tumores com uma secreção clínica plurihormonal representem apenas cerca de 5% a 7% dos adenomas da hipófise, estudos de biópsia revelam que a existência de tumores com activação de múltiplos genes codificadores das diferentes hormonas é comum, apesar da sua aparência monomórfica. Este fenómeno é mais frequente nos adenomas secretores de somatotrofina, onde surpreendentemente podem ocorrer todas as combinações possíveis de hormonas hipofisárias e até a existência de subpopulações celulares contendo hormonas hipotalâmicas clássicas. Estima-se que esta pleurihormonalidade aconteça em 10% a 30% de todos os tumores,^{235,236} sendo de 18% a mais de 50% nos somatotrofinomas, e de 20% a 100% nos prolactinomas.^{236,237,238} A multifuncionalidade das células hipofisárias anteriores normais sugere que o mesmo possa acontecer nos tumores não entrando assim em conflito com a crença habitual de que os defeitos genéticos ou outros ocorram em uma mesma célula.¹⁶³

Clonalidade

A clonalidade de uma expansão celular é assumida como um marcador molecular seguro, capaz de distinguir um insulto intracelular, de insultos provenientes do estroma ou do microambiente. A clonalidade seria uma evidência irrefutável de que os tumores da hipófise seriam induzidos por mutações somáticas isoladas. A questão é saber se, de facto, os fenótipos dos tumores da hipófise observados são compatíveis com uma expansão monoclonal e por outro lado, se essa clonalidade é uma condição *sine qua non* de formação tumoral. Ou seja, será que a análise da clonalidade dos adenomas da hipófise tem alguma utilidade em termos de diagnóstico, de patogenia e de prognóstico? Técnicas envolvendo a inativação do cromossoma X sugerem fortemente a existência de mais de um clone anormal de células em cerca de 50% dos tumores da hipófise no homem.^{239,240} Parece que a policlonalidade e a oligoclonalidade, mais do que a monoclonalidade, estarão particularmente ligadas à expansão celular. Se a policlonalidade estiver presente no início da expansão tumoral, espera-se que, com o tempo a pressão dos diferentes clones leve a uma redução do seu número. A partilha de uma arquitectura clonal, entre uma aparente monoclonalidade e uma policlonalidade, e uma cooperação clonal (em que um clone depende para a sua sobrevivência de outros clones), também têm sido descritas. Se acontecer um destes cenários na origem de um tumor da hipófise, poder-se-ão esperar não só mutações e perdas alélicas adicionais no tumor, como também a restauração de perdas alélicas originais. De facto, técnicas seguras têm sugerido fortemente a presença de mais do que um clone no início da expansão tumoral, em pelo menos 50% dos adenomas. A arquitectura clonal, neste contexto, correlaciona-se pouco com as características histológicas, o comportamento biológico e, em última instância, com o prognóstico. Em conclusão, a constatação da clonalidade nos tumores da hipófise não indica necessariamente que os tumores da hipófise derivem de uma única célula desinibida. O restauro da perda alélica, originalmente identificada em 50% dos tumores, e se confirmada em estudos adicionais, indica que a policlonalidade e oligoclonalidade mais do que a monoclonalidade, tendem a estar mais relacionadas com a indução tumoral, com os factores de supressão de outros clones (existentes abaixo do limiar de detecção) a eliminarem-se mutuamente. Independentemente da clonalidade, o dimorfismo fenotípico sexual nos prolactinomas sugere um papel importante do microambiente hormonal na propagação e comportamento do adenoma, senão mesmo na sua indução.¹⁶³

Aneuploidia

Uma pequena percentagem de adenomas tem um crescimento persistentemente anormal, sendo para a maioria relativamente modesto. Se as mutações de proto-oncogenes e de genes de supressão tumoral, os mecanismos clássicos de formação tumoral, são responsáveis e não apenas eventos de passagem no processo, então outros eventos ou circunstâncias modificadoras adicionais devem estar implicadas. A aneuploidia, que resulta de rearranjos cromossómicos, tem muito maior capacidade de induzir

neoplasia do que uma aneuploidia de todo o cromossoma por erros mitóticos.²⁴¹ A indução tumoral não é uma condição obrigatória na sequência de qualquer de um destes processos. A aneuploidia grosseira tem sido referida em cerca de 50% dos tumores esporádicos.²⁴² No entanto não tem sido associada a maior agressividade do tumor. Assim sendo, a aneuploidia nos tumores da hipófise no humano é muito comum, mas o significado de diversas áreas de perda de heterozigotia, condicionadas por rearranjos cromossômicos, como deleções, translocações e ampliações, ainda permanece desconhecido.¹⁶³

Síndromes genéticas ou hereditárias associadas ao desenvolvimento de tumores da hipófise

Os tumores da hipófise podem ocorrer em contexto familiar (4% a 5%^{2,243} ou 5% a 8%)²⁴⁴ e serem uma das manifestações de uma síndrome de linhagem germinal. Entre estas condições temos: a síndrome de McCune-Albright (MAS), a neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (MEN1), a síndrome com fenótipo *MEN1-like* (MEN4), o complexo de Carney (CNC)²⁴⁵ e as síndromes de tumores hipofisários isolados familiares (FIPA) [somatotrofinoma isolado familiar (IFS) e síndrome de predisposição para tumores da hipófise (PAP)]. Os genes para a proteína de ligação ao nucleótido guanina (GNAS, no 20q13), para a *menin* (no 11q13), e para a subunidade-1- α reguladora da cinase da proteína A (PRKAR1A, no 17q24) têm sido associados à MAS, MEN1, e CNC, respectivamente. A cinase inibidora 1B dependente da ciclina (CDKN1B, que codifica para p27, no 12p13) e a proteína de interação com o receptor aril hidrocarbono (AIP, também no 11q13, mas distinto da *menin*) estão associados ao fenótipo *MEN1-like* (cl clinicamente semelhantes à MEN1 mas com estudo genético negativo) e FIPA, respectivamente. O *AIP* mutado está maioritariamente presente na IFS, que tem somatotrofinomas e prolactinomas familiares, mas mesmo nesta síndrome a maioria dos doentes não apresenta mutações naquele gene, o que indica que certamente outros genes estarão envolvidos.

Síndrome de McCune-Albright

A síndrome de McCune-Albright resulta de um mosaicismo devido a uma mutação no oncogene *GNAS*, localizado no cromossoma 20q13, que codifica a proteína G α . Está associada com o mosaicismo, dado que, o gene mutado está presente apenas em algumas células, e não em todas, do doente. Clinicamente caracteriza-se pela tríade clássica da displasia fibrosa poliostótica, pigmentação cutânea café-e-leite, e hiperfunção de glândulas endócrinas, geralmente puberdade precoce periférica, mas podendo incluir a tirotoxicose, gigantismo hipofisário ou acromegalia, e a síndrome de Cushing.²⁴⁶ O excesso de secreção de GH surge em cerca de 20% dos casos, mas uma imagem tumoral hipofisária só é visível em escassos doentes.²⁷⁰ A concomitância do gigantismo-acromegalia agrava o quadro de displasia fibrosa, podendo levar a uma transformação sarcomatosa.²⁷⁰ A

mutação *GNAS1* é a única mutação somática identificada numa proporção significativa de tumores da hipófise esporádicos, ocorrendo em aproximadamente 30% a 40% dos somatotrofinomas. Contudo, e apesar dos extensos estudos, há pouca evidência de que a mutação *gsp* tenha um papel oncogénico primário importante nestes tumores, ou altere a sua velocidade de crescimento ou de recorrência.

Neoplasia endócrina múltipla do tipo 1

Os tumores da hipófise enquadrados em uma MEN1 representam cerca de 2,7%.²⁴⁷ A neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 ou síndrome de Wermer é uma doença autossómica dominante de penetrância incompleta caracterizada pela predisposição para desenvolver uma combinação de mais de 20 tumores em diversos órgãos endócrinos e não endócrinos.²⁴⁸ As suas manifestações *major* incluem o hiperparatiroidismo primário, e tumores endócrinos gastro-entero-pancreáticos e da hipófise. Estes surgem em cerca de 40% a 60% dos doentes; são prolactinomas em 60% dos casos, somatotrofinomas em 20% e corticotrofinomas ou tumores clinicamente não funcionantes, em menos de 15%,^{247,249,250} todos apresentando características semelhantes aos esporádicos. Para além destes, outros diversos tumores endócrinos (tumores da supra-renal, tumores endócrinos do intestino anterior: tímicos, brônquicos, gástricos *enterocromafin-like*) ou não endócrinos (cutâneos: angiofibroma, colagenoma, lipoma; sistema nervoso central: ependimoma, germinoma e outros: leiomioma) podem estar associados.²⁴⁸ A MEN1 deve-se a mutações germinais do gene *MEN1* localizado no cromossoma 11q13 que codifica uma proteína de 610 aminoácidos, a *menin*,²⁵¹ que interage com um largo espectro de alvos dos quais nenhum é, isoladamente, responsável pela indução tumoral. Em 1988, Larsson *et al.* associaram pela primeira vez o gene de susceptibilidade para a MEN1 ao locus no cromossoma 11q13.²⁵² O gene *MEN1* foi clonado em 1997.²⁵¹ As mutações são evidentes em 70% a 90% das famílias. Em 2008, Lemos e Thakker fizeram uma revisão das mutações descritas do gene *MEN1* e encontraram 565 mutações diferentes.²⁵³ Cerca de 70% das mutações levam a formas truncadas da proteína *menin*. Em 10% a 30% dos doentes com fenótipo típico de MEN1 a mutação não é detectável. Estes doentes, por vezes designados de 'fenocópias MEN1' podem apresentar-se como esporádicos ou em um quadro de uma família MEN1.^{254,255} O facto de nem sempre ser possível a identificação da mutação, faz pressupor que outros factores poderão estar envolvidos nestas famílias. O papel biológico do *MEN1* parece actuar como um gene de supressão tumoral. A *menin* interage potencialmente com a região promotora de milhares de genes, indicando que é um vasto factor de regulação de transcrição.²⁵⁶ Está largamente expressa, podendo desempenhar diferentes funções em diferentes tecidos. Provavelmente estará envolvida na regulação fisiológica de diversas funções celulares, incluindo a replicação e reparação do ADN, bem como na maquinaria de transcrição.²⁴⁸ Admitindo este seu papel na regulação da transcrição, divisão e proliferação celular, controlo da reparação do ADN e estabilidade do genoma, poder-se-á admitir que a acumulação de lesões genéticas poderá promover a tumorigénese em diferentes órgãos e tecidos. Nos tumores esporádicos, polimorfismos do gene *MEN1* estão presentes em 30% dos casos, perda de heterozigotia

no 11q13 em 14%, e mutações inativadoras na região codificadora do gene da *menin* em aproximadamente 1%. Defeitos do gene *MEN1* não terão um papel significativo nos tumores esporádicos. A predisposição da *MEN1* para tumores hipofisários com fenótipo secretor é semelhante à observada na doença esporádica, o que é intrigante e leva a pressupor que factores somáticos implicados nos casos esporádicos estarão igualmente envolvidos no segundo passo de indução tumoral nos casos *MEN1*; no entanto segundo alguns autores os tumores predominantes, os prolactinomas, terão um comportamento mais agressivo e menor resposta ao tratamento farmacológico.²⁵⁷

Cerca de 10% a 25% dos doentes com *MEN1* têm genes *MEN1* aparentemente normais, podendo estar implicadas a existência de deleções do gene *MEN1* ou mutações de outros genes de predisposição para este fenótipo. Aproximadamente 30% destas famílias com *MEN1* sem mutação (isto é, cerca de 3% do total) têm deleções parciais ou totais do gene *MEN1*, que não são identificadas por rotina em muitos laboratórios.^{258,259} Por outro lado uma mutação germinal *nonsense* no gene da cinase inibidora 1B dependente da ciclina (*CDKN1B*, também conhecida como p27 e KIP1) foi recentemente identificada em uma família com uma síndrome semelhante à *MEN1*;²⁶⁰ contudo a ocorrência destas mutações parece ser muito rara.²⁶¹ Nos tumores esporádicos não foram encontradas mutações no gene *p27*. Este regula negativamente a progressão do ciclo celular, pela inibição da ciclina e dos complexos das cinases dependentes da ciclinas. Na maioria dos tumores da hipófise verifica-se uma sub-expressão da proteína p27. Estudos mais recentes vêm a indicar que a p27 é um importante sinal a jusante da via de sinalização da *menin*, e um possível alvo do oncogene *RET* nas células endócrinas. É igualmente um alvo transcripcional directo do receptor aril hidrocarbono (AhR), o parceiro do *AIP*, que se sabe afectar a proliferação celular.

Finalmente refere-se que muito recentemente foi chamada a atenção para a importância das fenocópias e do esclarecimento do seu diagnóstico nas doenças hereditárias, que podem levar a diagnósticos e seguimentos menos correctos ou inapropriados.²⁵⁹ No caso da *MEN1*, as fenocópias podem mimetizá-la quer pela ocorrência de um tumor esporádico em um doente pertencente a uma família *MEN1* quer pela ocorrência de duas endocrinopatias mas de etiologia distinta, como são exemplo a descrição de um hiperparatiroidismo-*jaw tumor syndrome* (HPT-JT) por mutações no gene do hiperparatiroidismo do tipo 2 (*HRPT2*) e de uma hipercalcemia hipocalciúrica familiar (FHH) por uma mutação no gene do receptor sensível ao cálcio (*CaSR*), com consequências importantes quer para o doente quer para os seus familiares. Assim sendo impõe-se uma análise clínica e genética cuidadas das fenocópias, de forma a estabelecer um diagnóstico correcto e um seguimento optimizado, e por conseguinte prevenir erros.²⁵⁹

Síndrome com fenótipo *MEN1*-like (*MEN4*)

A síndrome *MEN1-like* (*MENX*) ou *MEN-4*, ocorre espontaneamente no rato e inclui múltiplos tumores neuroendócrinos, nomeadamente feocromocitoma, carcinoma medular da tiróide, adenomas das paratiróides, paragangliomas, hiperplasia pancreática e tumores da hipófise.^{262,263} Em experimentação animal o seu gene foi inicialmente identificado num

lócus no cromossoma 4 e posteriormente verificou-se ocorrer uma mutação no gene da ciclina dependente da cinase n1b (*cdkn1b*).²⁶⁰ No humano, o gene correspondente *CDKN1B* [que codifica o p27^{kip1}, membro da família Cip/Kip da família das cinases dependentes das ciclinas inibidoras (CDKIs)] localiza-se no cromossoma 12 e alguns autores encontraram mutações germinais deste gene em famílias *MEN1-like*.^{261,264,265,266} A proteína codificada liga-se e previne a activação da ciclina E-CDK2 ou do complexo ciclina D-CDK4, e por conseguinte controla a progressão do ciclo celular ao nível de G1. É frequentemente referida como uma proteína inibidora do ciclo celular, uma vez que a sua função *major* é a de parar ou lentificar o ciclo de divisão celular.

Apesar de esta síndrome ser muito rara, foram descritas mutações *nonsense* neste gene em cinco famílias com síndrome MEN1 negativa para mutações no gene *MEN1*.^{260,267} atendendo às características de MEN devidas a mutações do *CDKN1B/p27* no humano foi proposto que se designasse de MEN4.

Complexo de Carney

O complexo de Carney (CNC) é uma condição autossómica dominante rara (no registo mais vasto foram descritos cerca de 500 casos)²⁶⁸ caracterizada pela presença de mixomas em qualquer local do organismo (coração, pele, mama, etc.), manchas pigmentares cutâneas (múltiplos lentigos e nevos azuis), schwannomas, e hiperactividade endócrina ou tumores endócrinos (quistos do ovário, tumores da supra-renal, testiculares, tiroideus, e da hipófise). Os tumores da hipófise ocorrem em 6% a 21% dos doentes e, contrariamente à MEN1, nesta situação familiar apenas foram descritos somatotrofinomas sendo que quase todos também têm transcrição para a prolactina; uma minoria pode ser positiva para a TSH, LH e subunidade- α .²⁶⁹ Um aspecto distintivo da acromegalia no complexo de Carney é a hiperplasia multifocal dos mamossomatotrofos, com inclusão de tecido hipofisário não adenomatoso no seio do tumor. A acromegalia, em si, não é frequente no complexo de Carney (10% dos casos), mas cerca de 75% dos doentes apresentam elevações assintomáticas de GH, de IGF-1 e de prolactina assim como respostas anormais às provas dinâmicas.² Habitualmente estes tumores não têm um comportamento agressivo sendo diagnosticados na terceira década da vida.²⁷⁰ Cerca de 40% a 73%²⁷¹ dos doentes tem uma mutação germinal inactivadora no gene codificador da subunidade reguladora tipo 1 α da cinase da proteína A dependente do AMPc (*PRKAR1A*).²⁷² A cinase da proteína A (PKA) é uma holoenzima tetramérica, composta de duas subunidades catalíticas e duas subunidades reguladoras. Quando livre, a PKA é inactiva; quando ligada ao AMPc, há uma alteração conformacional dos dímeros, com dissociação das subunidades catalíticas enzimaticamente activas. Níveis adequados da subunidade reguladora 1 (*PRKAR1*) são críticos para a protecção intracelular, uma vez que se trata de um componente chave da regulação da via de sinalização do AMPc, que tem sido implicada na indução tumoral endócrina.⁴⁵ A *PRKAR1A*, tal como a *menin*, actua como um gene de supressão tumoral. No complexo de Carney os somatotrofinomas têm perda do alelo normal do gene *PRKAR1A*, o que leva a activação do sinal de tradução induzido pela GHRH. O gene *PRKAR1A* está normalmente expresso, e sem mutações, em praticamente todos os somatotrofinomas

esporádicos.^{273,274} Alguns autores sugerem que mutações no cromossoma 2p16 possam ser igualmente responsáveis pelo complexo de Carney, mas esta associação não está ainda bem esclarecida nem o locus identificado. Em diversos trabalhos realizados nos tumores hipofisários esporádicos, não foram encontradas mutações no *PRKAR1A* o que sugere que a inativação deste gene não é uma causa significativa destes tumores.²⁷⁵

Tumores hipofisários isolados familiares (FIPA)

Nos finais dos anos noventa, Daly *et al.*, descreveram três famílias com acromegalia familiar que não estavam associadas a MEN1 ou complexo de Carney.²⁷⁶ Por essa altura notaram também que havia igualmente outros tumores da hipófise, dos diferentes tipos, que surgiam em um contexto familiar, tendo designado esses casos de adenomas da hipófise isolados familiares (FIPA).²⁷⁷ Posteriormente outros autores vieram a descrever igualmente famílias FIPA, tendo num estudo de colaboração multicêntrico entre França, Itália e os Estados Unidos, sido identificadas mais de 120 famílias.²⁷⁸ Actualmente mais de 200 famílias já foram descritas, evidenciando uma herança autossómica dominante de penetrância incompleta e variável, devido a um fundo genético heterogéneo, e sem as características clínicas e genéticas da síndrome MEN1 e do complexo de Carney.²⁴³

Os tumores hipofisários isolados familiares são uma síndrome rara que inclui a síndrome do somatotrofinoma isolado familiar (IFS) bem como a síndrome de predisposição para adenomas hipofisários (PAP). Aliás, na última década, estas famílias já tiveram diferentes designações. As formas mais frequentes de FIPA incluem somatotrofinomas ou prolactinomas familiares; contudo qualquer tipo de tumor da hipófise pode ocorrer em um contexto familiar.²⁸² Em cada família os tumores podem ser do mesmo tipo (apresentação homogénea) ou de diversos tipos (apresentação heterogénea). A frequência dos diferentes tipos de tumor nos FIPA é de: prolactinomas (41%), somatotrofinomas (30%), não secretores (13%), mamossomatotrofinomas (7%), gonadotrofinomas (4%), corticotrofinomas (4%) e tirotrofinomas (1%). Os FIPA diferem da MEN1 pela menor frequência de prolactinomas e maior frequência de somatotrofinomas.^{278,279} Os doentes com FIPA são habitualmente mais jovens no momento do diagnóstico e têm tumores de maior dimensão. Os PAP constituem o grupo de doentes com FIPA, especialmente os com IFS, que têm mutações germinais no gene *AIP*. Em 2006, Vierimaa *et al.*,²¹² descrevem pela primeira vez a ocorrência de adenomas da hipófise em duas famílias finlandesas devido a mutações germinais no gene codificador da proteína de interacção do receptor aril hidrocarboneo (*AIP*). Neste estudo, 8 de 55 (14,5%) doentes com predisposição para tumores da hipófise secretores de GH e de PRL tinham uma mutação germinal Q14X no exão 1 do *AIP*. Destes doentes, 40% foram diagnosticados antes dos 35 anos. Posteriormente foi descrita esta mutação em outras famílias de outros países. A maioria destes adenomas são somatotrofinomas, mamossomatotrofinomas ou prolactinomas. Foram descritas três mutações com baixa penetrância, nos tumores. Na série FIPA inicial, em que foram estudadas 73 famílias, 15% tinham mutações germinais no *AIP*.²⁹⁸ Estudos posteriores encontraram igualmente mutações germinais do *AIP* entre 15% a 40% dos doentes nas famílias FIPA.^{243,280,281,282} Nos tumores esporádicos, esta mutação está

presente em apenas cerca de 1% a 3%,²⁸³ é mais prevalente em doentes mais jovens, e os tumores podem ter um comportamento mais agressivo e responder menos eficazmente aos análogos da somatostatina.²⁸⁴

Em 1995 foi, pela primeira vez, sugerido que o gene envolvido na síndrome de somatotrofinoma isolado familiar seria distinto do gene *MEN1*. Desde então, diversos estudos demonstraram perda da heterozigotia no cromossoma 11q13, em uma região distinta da do gene *MEN1*, embora de localização muito próxima a este gene, sugerindo tratar-se da perda de função de um gene de supressão tumoral. Estudos posteriores descreveram o locus no cromossoma 11q13.3 como tendo aproximadamente 2,21 Mb. A ligação dos doentes com IFS ao cromossoma 11q13.1-11q13.3 foi pela primeira vez estabelecida por Gadelha *et al.*,²⁸⁵ sendo actualmente reconhecido que muitos destes doentes têm uma mutação no *AIP*. O gene *AIP* localiza-se na vizinhança do gene *MEN1* no 11q13, na área do genoma que contém o gene que se considerava ser o responsável pelo somatotrofinoma isolado familiar.²⁴³ O gene consiste em seis exões e codifica uma proteína *co-chaperone* (actua na retenção citoplasmática da forma latente do receptor aril hidrocarbono) de 330 aminoácidos, que desempenha um papel importante no tráfego sub-celular, com potencial transactivação e estabilidade do receptor nuclear.^{286,287} Uma proteína *chaperone* tem como função principal concorrer para o enovelamento e manutenção da estrutura de macromoléculas, sem contudo interferir quando aquelas desenvolvem as suas funções biológicas normais. A região carboxi-terminal da proteína *AIP* contém três domínios tetratricopeptídeos (TPR). Esta estrutura C-terminal é importante para a função do *AIP*. A maioria da informação disponível sobre a relação estrutura-função do *AIP* está no terceiro domínio TPR3 e nos aminoácidos dessa região C-terminal. O terceiro domínio é necessário para a interacção do *AIP* com um dímero da proteína de choque térmico 90 (Hsp90) e com o receptor AhR.²⁸⁸ A proteína *AIP* tem uma ampla distribuição nos tecidos, estando presente no coração, cérebro, placenta, pulmão, músculo esquelético, rim, pâncreas, baço, timo, próstata, testículo, ovário, intestino delgado, cólon, leucócitos, hipófise e fígado.^{243,289} Na hipófise normal, a proteína *AIP* tem sido identificada nas células secretoras de somatotrofina e de prolactina.²⁸⁹ Um facto interessante é o da microscopia electrónica sugerir a associação da *AIP* às vesículas secretoras das células normais produtoras de GH e de prolactina. O papel exacto da *AIP* nos diferentes tecidos não é claro. O que actualmente se sabe é que, como já mencionado, o *AIP* codifica uma proteína que faz parte de um complexo multiproteico *chaperone* para o receptor aril hidrocarbono, que também contém a proteína de choque térmico 90 e o p23.²⁹⁰ O receptor aril hidrocarbono é um ligando de activação de factores de transcrição aos quais a dioxina e substâncias químicas semelhantes se ligam com elevada afinidade. Após a sua ligação aos ligandos, sofre translocação para o núcleo, onde forma um complexo com o receptor nuclear translocador aril hidrocarbono, com posterior activação de genes de transcrição envolvidos no metabolismo xenobiótico.²⁹¹ Esta proteína pode regular a expressão de diversas enzimas metabolizadoras xenobióticas. A maioria dos dados refere-se à sua relação com o AhR e com o metabolismo das toxinas, apesar da sua expressão hepática ser relativamente baixa quando comparada com outros tecidos. O receptor aril hidrocarbono está também envolvido em outras vias de sinalização, incluindo

interacções com a proteína do retinoblastoma e p27^{kip1}.^{292,293} O AIP protege o receptor aril hidrocarbono da acção da ubiquitina, prolongando a sua semi-vida e prevenindo a sua acção como factor de transcrição. O AIP também interage com a fosfodiesterase 4A5, que hidrolisa o AMP cíclico; a existência de mutações causa a disrupção desta interacção.²⁹⁴ Concluindo, esta proteína para além da regulação das enzimas xenobióticas, também interfere em vias de proliferação celular e em algumas fosfodiesterases que controlam o AMPc intracelular.²⁴³

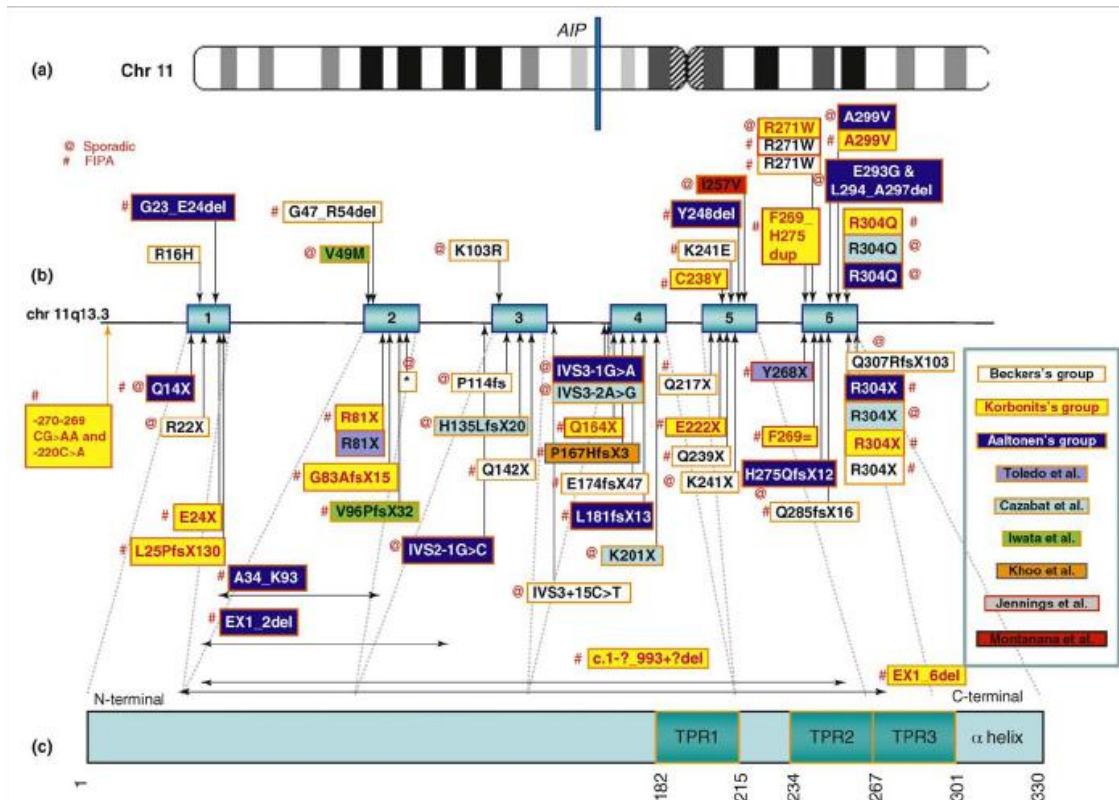
As características clínicas das famílias FIPA estão sempre em actualização, uma vez que esta entidade é rara e só recentemente foi descrita. Contudo alguns aspectos gerais já se podem claramente inferir: a maioria das séries FIPA consiste em famílias com 2 a 5 membros portadores de tumores da hipófise; entre as famílias há heterogeneidade de tumores hipofisários,^{265,278,279,295} sendo os somatotrofinomas, prolactinomas e mamossomatotrofinomas os mais frequentes,²⁶⁵ mas outras combinações envolvendo tumores não funcionantes, corticotrofinomas e gonadotrofinomas também foram descritas;²⁷⁸ os casos familiares têm, em média, uma idade de diagnóstico inferior em quatro anos em relação aos casos esporádicos, mas nas famílias com mutações *AIP* a idade de início é ainda inferior, podendo atingir a idade pediátrica.²⁹⁶ Os doentes das últimas gerações tendem a ser significativamente mais jovens do que os das gerações anteriores, possivelmente pelo diagnóstico mais precoce. Chahal SH *et al.* encontraram uma idade média na primeira geração de 41,3 anos (DP 17,1 anos) e de 23,6 anos (DP 10,4 anos) na segunda geração ($p < 0,0001$).²⁴³

As características clínicas das famílias com e sem mutações do *AIP* parecem ser distintas. As mutações germinais do *AIP* foram maioritariamente encontradas em famílias com somatotrofinomas puros ou em famílias com mistura de somatotrofinomas e prolactinomas. Isto é verdade mesmo para os poucos tumores que se apresentaram como não funcionantes, sendo somatotrofinomas ou prolactinomas silenciosos. Pelo contrário, nenhuma família com prolactinomas puros evidenciou mutações do *AIP*, e nenhuma mutação do *AIP* foi encontrada em uma família FIPA que não tivesse, pelo menos um membro com um somatotrofinoma ou prolactinoma.²⁴³ O diagnóstico dos tumores nos indivíduos com mutações, foi 13 a 15 anos mais precoce,^{265,278} tendo 6 anos de idade o doente mais jovem, que apresentava um volumoso tumor.²⁸² Os doentes FIPA e com mutações *AIP* apresentam tumores de maiores dimensões do que os sem mutações *AIP*, ou mesmo do que os casos esporádicos.^{282,289,298} De momento ainda não foi encontrada uma correlação fenótipo-genótipo nas famílias com mutação *AIP* em termos de subtipo de tumor e de nível de penetrância. A penetrância dos tumores da hipófise é aproximadamente de 30% nas famílias com mutação *AIP*;^{243,282} no entanto há famílias com maior e menor penetrância, não se conhecendo ainda o que determina esta característica, podendo existir outro locus associado. A penetrância parece ser um pouco superior em famílias com mais de três membros com mutação *AIP*.^{243,282} Estes achados sugerem fenótipos distintos para as famílias *AIP* positivas e negativas.

Foram encontradas quarenta e nove variantes do gene *AIP*, incluindo deleções, inserções, duplicações segmentares, *missense*, *splice-site* e mutações do promotor, bem como grandes deleções de exões completos ou do próprio gene *AIP*. Trinta e cinco das quarenta

e nove mutações resultam em uma deleção da região C-terminal da proteína AIP, o que vem a confirmar a importância desta região para a actividade biológica do AIP.^{243,265,279}

Na figura seguinte está esquematizado o gene AIP e suas variantes conhecidas, à data da sua publicação.



Gene AIP e suas variantes: (a) Cromossoma 11 humano com a localização do gene AIP na região 11q13. (b) Foram identificadas 49 variantes até ao momento da publicação. As mutações apresentadas por baixo do gene estão dispersas ao longo do seu comprimento e várias delas induzem disrupção da proteína. As mutações apresentadas por cima do gene induzem alterações dos aminoácidos: ou deleções ou inserções. A maioria agrupa-se ao nível da região C-terminal, conhecida como importante para a função da proteína AIP. As mutações identificadas em famílias, estão marcadas com # e as mutações identificadas em tumores esporádicos, com @. O * representa mutações em que não há detalhes especificados. (c) Estrutura da proteína AIP. Os números representam os aminoácidos. Os três domínios TPR e a hélice-α terminal são importantes para a ligação da proteína e para a sua função. Figura de Chahal HS, Chapplem JP, Frohman LA, et al. *Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA)*. *Trend Endoc Metab* 2010;21:419-427.

A verdadeira prevalência das mutações AIP é difícil de estabelecer, uma vez que o rastreio de grandes deleções não foi sistematicamente pesquisado pela análise *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MPLA). A melhor estimativa, é a que considera os três grandes estudos com 167 famílias FIPA em que o AIP foi sequenciado, e em que se encontraram mutações em 38 (22%).^{212,243,265,296} Se só forem analisadas as famílias com somatotrofinomas familiares isolados, 30 de 75 (40%) têm mutação no AIP. Se forem consideradas as famílias homogéneas e heterogéneas de somatotrofinomas então 35 de

125 (28%) têm mutações no *AIP*. Aproximadamente 50% das famílias com somatotrofinomas isolados familiares, não têm transmissão da doença.²⁶⁵ Isto pode ser devido a uma combinação de: maior agressividade do tumor, efeitos secundários da cirurgia e da radioterapia no tecido hipofisário não tumoral, e perda da função gonadotrófica.²⁹⁷ A via AhR está envolvida no eixo da reprodução, mas a relevância do seu efeito quer na fertilidade quer na transmissão da doença nos indivíduos com mutação *AIP*, é desconhecida.²⁴³ Vários estudos, incluindo o elaborado e apresentado neste trabalho, investigaram a presença de mutações *AIP* em tumores hipofisários aparentemente esporádicos. Até ao momento foram estudados cerca de 1.100 doentes. Destes, 27 tinham mutações germinais no *AIP*, dando uma prevalência estimada de aproximadamente 2% para todos os tumores, e de 2,7% para os somatotrofinomas. Torna-se interessante o facto de, até ao momento, não terem sido identificadas mutações somáticas nos tumores hipofisários.^{243,265,282}

Em séries recentes, cerca de 66% dos doentes com mutações no *AIP* evidenciam tumores da hipófise.²⁸⁹ As mutações do gene *AIP* também resultam em proliferação de células inalteradas quando inseridas em linhas celulares hipofisárias de cultura GH3, HEK293 e TIG3. Assim sendo, o *AIP* parece ser um gene de supressão tumoral, e mutações neste gene estão envolvidas pelo menos em alguns doentes com IFS. Por outro lado, aproximadamente 85% dos FIPA e 50% dos IFS são negativos para mutações no *AIP*.²⁹⁸ Finalmente, o gene *AIP* pode ser excluído como um gene candidato para o desenvolvimento da maioria dos tumores esporádicos, uma vez que é extremamente raro estar mutado e, a existir alguma alteração, será uma sobre-expressão (possivelmente como um factor compensador) em todos os tipos de tumores.²⁹⁹

Assim sendo, e sob o ponto de vista clínico, deve ser considerada a pesquisa de mutações no *AIP* em pelo menos um dos membros das famílias afectadas, desde que tenham os critérios de definição dos FIPA. Uma vez que os tumores com mutações *AIP* são mais agressivos e surgem mais precocemente, é importante identificar os portadores, de forma a possibilitar um diagnóstico atempado. Se não houver tumor na RM, o seguimento dos portadores da mutação deve ser efectuado de forma regular (anualmente) com base nos sintomas e nos doseamentos hormonais (IGF-1 e prolactina). A evidência, até ao momento, também sugere que doentes jovens com tumores da hipófise agressivos têm maior probabilidade de serem portadores de mutações *AIP* (até 15% a 20% em doentes com macroadenomas diagnosticados antes dos 30 anos), pelo que a pesquisa destas mutações, em tumores aparentemente esporádicos, deve ser limitada apenas aos doentes jovens e com tumores agressivos. Também não se pode esquecer que só uma minoria dos FIPA (15%) tem mutações no *AIP* pelo que outros estudos moleculares são necessários para elucidar a sua etiopatogenia.²

Outros genes de supressão tumoral, oncogenes, factores de crescimento e reguladores do ciclo celular

Os estudos moleculares em tumores da hipófise têm mostrado que, as alterações nos genes de supressão tumoral mais conhecidos em outras neoplasias (ex. *P53* e *RB*) ou nos oncogenes comuns (ex. família *Ras*) só raramente estão envolvidos no seu desenvolvimento.^{300,301,302,303} Apesar da existência de mutações pontuais no oncogene *Ras*, da perda de heterozigotia (LOH) junto ao locus *RB* no cromossoma 13 e LOH no cromossoma 11, terem sido implicadas em alguns tumores, estas são claramente uma minoria. Um estudo recente mostrou a presença de mutações no gene *P53* nos carcinomas, e a sua ausência nos adenomas (nos carcinomas, uma mutação do gene *P53* foi adicionalmente associada à sobre-expressão da proteína p53 nas células tumorais, o que pode ser útil em termos de diagnóstico).^{164,304}

Outras alterações genéticas têm sido implicadas na génese tumoral hipofisária: aumento da expressão do gene de transformação tumoral hipofisário (*PTTG*), alternativa da transcrição inicial dos factores dos receptores derivados dos fibroblastos dos tumores da hipófise (Pdt-FGFR4), ou metilação dos promotores dos genes de supressão (ex. *RB*). O gene de paragem do crescimento e lesão do ADN induzidos pela proteína gama (*GADD45G*), a expressão materna da proteína 3A (*MEG3A*), o *zinc-finger protein pleiomorphic adenoma gene-like 1* (*ZAC*), a cinase da proteína associada à morte (DAP cinase), o gene da apoptose do tumor hipofisário (*PTAG*), e o gene *p27* (*Kip 1*), foram todos encontrados com uma expressão anormal nos adenomas da hipófise tornando provável o seu desempenho de um papel na tumorigénese hipofisária.^{305,306,307,308}

O *PTTG* foi identificado e clonado em células de cultura GH4 do rato.³⁰⁹ O aumento da expressão do *PTTG* ocorre em uma variedade enorme de tumores endócrinos e não endócrinos, incluindo os da hipófise, tiróide, ovário, mama, próstata, pulmão, esófago, cólon e sistema nervoso central.³¹⁰ Ao actuar como uma proteína securina e inibindo a separação prematura das cromátides, desempenha um papel importante na mitose. O *PTTG*, quando apresenta expressão aumentada, induz transformação celular em células de cultura, bem como formação tumoral em animais de laboratório. Estimula o factor de crescimento dos fibroblastos básico (*bFGF*), que é um potente factor mitogénico e angiogénico *in vitro*, e interage com o gene de supressão tumoral *P53* e com o *c-myc* proto-oncogene. Adicionalmente a fosfoinositol-3-cinase (PI3K) e MAPK interagem com o *PTTG*, sugerindo que a fosforilação do *PTTG* ocorra nestas duas cascatas.^{311,312} A interacção do *PTTG* com Sp1, um importante factor envolvido na regulação de diversos genes associados ao crescimento e diferenciação celular, está bem documentada. Concluindo, o *PTTG* actua no centro de uma rede de processos que controlam a proliferação e divisão celulares, sendo ambas, as sub-regulações ou sobre-regulações, inimigas de um crescimento celular normal. Apesar destas evidências, não foram encontradas mutações específicas do *PTTG* nos tumores esporádicos da hipófise.¹⁶⁴ Alterações na expressão do *PTTG* podem estar relacionadas com a angiogénese tumoral, bem como com a invasibilidade e agressividade.^{310,313} Verificou-se uma correlação entre a expressão do *PTTG* e do Ki-67 nos tumores da hipófise.³¹³

Alterações das proteínas do ciclo celular e marcadores de proliferação

O ciclo celular e a proliferação celular dependem de uma série de cinases altamente organizadas e sequenciais, que aumentam e diminuem em cada divisão celular. No ciclo celular as ciclinas são fosforiladas (por cinases dependentes das ciclinas, CDKs) e posteriormente degradadas de forma sequencial, levando à síntese do ADN, separação cromossômica e mitose. O papel do *PTTG*, ou securina, neste processo já foi discutido. Igualmente muito importante para esta coordenação é o envolvimento de uma série de inibidores das CDKs (CKIs). O mais importante, o passo da ciclina D/CDKs4/6 para a ciclina E/CDK2 é regulado por uma série de CKIs conhecidas como a família Ink4 (p15, p16, p18, para CDK 4 e 6) e a família kip/cip (p21, p27, p57 para CDK2). Uma célula atravessando este ponto, fosforila o Rb, levando à dissociação da E2F e indução da capacidade de proliferação celular [a forma activa do Rb está hipofosforilada e liga-se aos factores de transcrição E2F; isto leva a uma restrição na progressão do ciclo celular na passagem da fase de G1 para a fase S (a fase de síntese na qual o ADN é replicado)],^{164,314} que leva à divisão celular irreversível; portanto, uma disrupção a este nível é de extrema importância. Esta função do Rb previne que o ADN lesado se replique. É interessante saber que modelos animais transgênicos *knockouts* de muitas das CKIs, têm um aumento de probabilidade de formação de tumores da hipófise. No homem, a vasta maioria dos tumores evidencia alterações na via do *RB1* (90%), especialmente hipermetilação dos genes *p15* (INK4b), *p16* (INK4a) e *RB1*, encontrada em 32%-36%, 59%-71% e 29%-35% dos casos, respectivamente.^{315,316} Yoshino *et al.* demonstraram adicionalmente, hipermetilação dos genes *p14* (ARF), *p21* (Waf/Cip1) e *p73* em 6%, 3% e 12% dos tumores, respectivamente, mas o promotor do *p27* (Kip1) não estava hipermetilado.³¹⁶ No entanto outros autores descreveram a sub-expressão da proteína do *p27* em todos os tipos de tumores da hipófise, especialmente nos corticotrofinomas.^{317,318} Por conseguinte, a desregulação do ciclo celular parece ser uma característica da formação dos tumores da hipófise, ocorrendo quer por metilação do promotor das CKIs, quer por um aumento da sua degradação.

A metilação inapropriada de ilhas CpG de outros genes chave do controlo do ciclo celular, e de reguladores do crescimento, tem sido demonstrada. Tais genes incluem o GADD45G (gene da paragem do crescimento e de lesão do ADN induzíveis pela proteína gama),³¹⁹ e a proteína cinase associada à morte (DAP cinase).³²⁰ A GADD45G regula negativamente o crescimento celular estando significativamente sub-expressa nos somatotrofinomas e prolactinomas.³²¹ A cinase DAP codifica a cinase serina/treonina dependente da calmodulina, que está positivamente programada para a morte celular. A perda da expressão da cinase DAP foi demonstrada em células altamente metastáticas, enquanto que a re-expressão da proteína resultou em uma redução do crescimento do tumor e diminuição da incidência de metástases. A perda da expressão da cinase DAP (associada à metilação das ilhas CpG ou deleção em homozigotia) surge preferencialmente nos tumores da hipófise que mostram um fenótipo invasivo.³²⁰

Um novo gene metilado do cromossoma 22, associado à ilha CpG (C22 ou f3), também conhecido por o gene de apoptose tumoral hipofisária (PTAG), foi recentemente

identificado. A maioria dos tumores da hipófise (80%) não expressam este gene, em comparação com a hipófise normal, sendo que neste grupo aproximadamente 20% evidenciam metilação da ilha CpG do promotor PTAG. A metilação do promotor está invariavelmente associada à perda da transcrição genética.³²² No modelo animal, a expressão do PTAG *per se* não terá efeitos discerníveis directos na proliferação, perfil e viabilidade do ciclo celular. Contudo, a sua expressão aumentada foi associada a um aumento significativo dos efeitos apoptóticos induzidos pela bromocriptina.³²³

Outros genes, com um eventual papel na indução tumoral baseado na metilação dos dois promotores, incluem o gene da expressão materna da proteína 3 A (MEG3A)³²⁴ e o da ZAC.³²⁵ A MEG3 está largamente expressa na hipófise normal, mas não foi detectada nos tumores hipofisários não funcionantes. O gene ZAC codifica uma nova proteína *zinc-finger*, indutora da apoptose e da paragem do ciclo celular. Localiza-se no cromossoma 6q24-q25, um conhecido *hot spot* do cancro. O ZAC está altamente expresso na hipófise anterior e a sua inactivação promove a proliferação das células hipofisárias. Foi descrita uma forte sub-regulação do ARNm da ZAC e da expressão da proteína em tumores da hipófise não funcionantes, embora não associada a mutações do gene.³²⁵

No caso do *p27* não há hipermetilação, mas observa-se uma diminuição do nível das proteínas codificadas por este, embora o ARNm seja normal ou aumentado e mutações somáticas não tenham sido descritas.^{318,326} A expressão do *p27* está reduzida nos adenomas da hipófise (incluindo adenomas ACTH, PRL, GH, LH/FSH e TSH) comparativamente às células normais, e completamente ausente nos carcinomas.³¹⁸ Mais, a expressão do *p27* está inversamente relacionada com o Ki-67. A fosforilação é essencial para a degradação do *p27*, e foi demonstrado estar mais elevada nos adenomas da hipófise do que no tecido hipofisário normal.^{327,328}

Estudos recentes vieram a demonstrar múltiplas alterações moleculares nos tumores da hipófise, especialmente as envolvidas no ciclo celular. Muitas das modificações parecem reflectir mecanismos epigenéticos associados ao silenciamento dos genes, particularmente dos inibidores do ciclo celular. O gene *PTTG* é um gene com uma expressão significativamente aumentada, podendo levar a um aumento da proliferação celular e instabilidade cromossómica. O isolamento de novos genes nos tumores da hipófise (ex. *PTTG*, *Pdt-FGFR4*, *GADD45G*, *MEG3A*, *ZAC*, cinase *DAP* e *PTAG*) oferece um contributo importante para o conhecimento destes processos tumorais. A reversão de genes aparentemente silenciados, pode eventualmente levar a uma 'sensibilização' para estratégias terapêuticas, nomeadamente de quimioterapia e radioterapia.¹⁶⁴

Os marcadores de proliferação celular têm sido desapontadores como indicadores de prognóstico da agressividade destes tumores. O índice mitótico Ki-67, reconhecido pela Organização Mundial de Saúde para classificação dos tumores da hipófise em atípicos quando é superior a 3%, não tem o valor preditivo desejado.³²⁹ A única correlação entre o Ki-67 e as características do tumor é encontrada em doentes jovens que têm tendência a ter índices mais elevados, um facto que parece estar mais relacionado com a idade dada a diminuição da actividade mitótica na hipófise normal.¹⁶³ Alguns autores³³⁰ consideram que um Ki-67 superior a 10% deve ser motivo de preocupação e de comportamento mais atento e interventivo uma vez que poderá estar associado aos carcinomas da hipófise que,

como já referido, são excepcionais. Embora a mitose e apoptose sejam mecanismos moleculares independentes, verifica-se que um aumento da mitose induz uma aceleração da apoptose, e que uma apoptose estimulada leva a uma mitose acelerada, o que implica que um insulto em uma destas vias tróficas terá um efeito final pequeno no crescimento global do tumor.^{331,332} Isto leva a um conceito geral na biologia tumoral de que mutações que aumentem especificamente a mitose ou diminuam a apoptose podem não ser suficientes, isoladamente, para induzir neoplasia.

Mais recentemente tem sido descrita a actividade de vários genes com um papel crucial nos distintos processos do ciclo celular e apoptose. Entre estes foram descritos três principais, Lats-1 (uma cinase da proteína com actividade de supressão tumoral por regulação da progressão do ciclo celular e apoptose), a cinase da proteína pró-apoptótica Mst-2 (membro da família das proteínas GCKII), e a hSav1 (uma proteína de suporte que se liga simultaneamente à Lats-1 e à Mst-2). No entanto, de momento, ainda não está estabelecido o papel destes genes no crescimento do tumor e consequentemente as suas potencialidades para o tratamento.¹⁶³

Vias de sinalização específicas da hipófise

Uma vez que parece existir uma desregulação do processo de retrocontrolo nos somatotrofinomas e corticotrofinomas, foram estudadas alterações das vias de sinalização específicas da hipófise. Os estudos mais elaborados, e cujos resultados conhecidos foram obtidos na doença de Cushing e na acromegalia, indicam diversos locais possíveis de desorganização da sinalização dos corticotrofos e somatotrofos. Contudo estas alterações podem ser comuns a outros tipos de adenomas não tendo sido detectada nenhuma mutação a este nível que pudesse explicar o processo tumoral.¹⁶⁴

Vias de sinalização anormais

Alterações nas vias de sinalização celular são frequentemente observadas nos tumores da hipófise. A clarificação de determinado componente envolvido na regulação destas vias pode representar a identificação de lócus ou loci de iniciação das alterações observadas como também identificar potenciais alvos para o tratamento anti-tumoral. As cinases serina-treonina, incluindo mediadores chave da tumorigénese como o Raf, a cascata da cinase da proteína activadora da mitogénese (MAPK) e Akt (também conhecida como proteína cinase B), parecem ter um particular interesse.³³³

A via PI3K/Akt/mTOR está alterada em muitos tumores, incluindo os da hipófise. A fosfatidilinositol-3 cinase é activada como resultado da activação dos receptores da cinase da tirosina dependente de um ligando, receptores acoplados a proteínas G ou integrininas. A activação da PI3K independente de receptor também pode ocorrer, como por exemplo, nas células que expressam uma proteína Ras constitucionalmente activa.^{334,335} O alvo de fosforilação da PI3K melhor caracterizado é a Akt, resultando na fosforilação de uma série

de outras proteínas que afectam o crescimento celular, a entrada no ciclo celular e a sobrevivência celular. A fosforilação da Akt induz a activação da cinase serina-treonina mTOR (*mammalian target of rapamycin*), que activa a proteína S6 cinase ribossómica 40S (p70S6K)³³⁶ e inactiva a proteína de ligação 4E (4E-BP1). A 4E-BP1 inibe o início da translação do ARNm para diversos factores, incluindo c-myc e ciclina D1, através da sua associação com o e1F-4E,^{337,338} e portanto a perda da proteína de ligação em resposta à activação da mTOR, levará a aumento de proliferação. A Akt está sobre-expressa (quer a nível do ARNm, quer da proteína) bem como hiperactivada (através da fosforilação) em todos os tumores da hipófise, especialmente nos clinicamente não funcionantes.³³⁹ Esta sobre-regulação da Akt levará a um aumento da fosforilação do p27, impedindo a sua importação nuclear e causando, pelo menos, algumas alterações no ciclo celular como acima explicadas. Portanto, alterações no ciclo celular que ocorrem nos tumores da hipófise, podem ser secundárias à activação da via da Akt.³³⁹

A via Raf/MEK/ERK é uma hierarquia de cascatas com origem na membrana celular, com receptores para agentes de mitogénese ou factores de crescimento, que recruta, via proteínas de adaptação e factores permutadores, a pequena guanosina trifosfatase (GTPase) Ras.³³³ A Ras activada, por sua vez induz activação da Raf (MAPKKK), que é uma cinase serina-treonina. A Raf activa a *mitogen-activated protein kinase kinase* (MAPKK), também conhecida por MEK; a MEK, por sua vez, condiciona fosforilação e activação da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK, ou ERK1 e ERK2), que sofre translocação para o núcleo e leva a transactivação de factores de transcrição e modificação da expressão génica, de forma a promover o crescimento e a mitose.³⁴⁰ Esta activação da via MAPK condiciona fosforilação e activação da cinase S6 ribossómica e de factores de transcrição, tais como c-myc, Elk1, c-Fos e a ciclina D1,^{341,342} semelhante à cascata Akt/mTor, resultando na activação de genes associados à proliferação³⁴³ e levando à transformação celular.³⁴⁴ O aumento da activação da Akt pode levar também, via alterações na cinase GSK3 β , à activação da via da β -catenina, que foi implicada na indução tumoral hipofisária.³⁴⁵

O Raf mais sensível, B-Raf, está frequentemente mutado na posição V600E nos melanomas e carcinomas papilares da tiróide, condicionando uma activação constitucional. Nos tumores esporádicos da hipófise não se encontra mutação semelhante; contudo, está sobre-expresso, particularmente nos tumores clinicamente não funcionantes.³⁴⁶ O *Bcl-associated athanogene* (BAG1), que está sobre-expresso nos somatotrofos e nos tumores hipofisários clinicamente não funcionantes, pode também aumentar a actividade do B-Raf.³⁴⁷ Grossman *et al.*, têm dados recentes e preliminares indicando que tanto a MEK1/2 como o seu regulador a jusante, o ERK1/2, estão igualmente hiperfosforilados, e por conseguinte hiperactivados em todos os tipos de tumores da hipófise, comparativamente à hipófise normal.³⁴⁸ A hiperactivação do ERK, um produto final da via MAPK, foi também associada a um aumento da ciclina D1.³⁴⁸ Estudos futuros dever-se-ão focar em avaliar o papel dos reguladores consecutivos ERK1/2, e de possíveis correlações entre as vias B-B-Raf/MEK/ERK e PI3K/Akt/mTOR, especialmente porque recentemente foi demonstrado que estas vias têm um importante papel, não só na transformação maligna, como também na resistência às terapêuticas.³⁴⁹

Os tumores da hipófise caracterizam-se por uma hiperactividade de ambas as vias Akt e MAPK; este facto é um achado em muitos destes tumores, sugerindo que as alterações no ciclo celular podem ser secundárias a anormalidades na sinalização celular. Também há alterações na via da β -catenina, que está envolvida na inibição do contacto celular através das caderinas. Há autores que especulam que, alterações a nível dos receptores dos factores de crescimento a nível da superfície celular e sua modulação pelas integrinas e caderinas, podem conter a chave da patogénia hipofisária.

Em resumo, acredita-se que um número de factores genéticos, incluindo hormonas, factores de crescimento e reguladores do ciclo celular actuam conjuntamente com diferentes eventos epigenéticos no processo de formação tumoral hipofisário. A maioria dos tumores é esporádica, mas alguns enquadram-se em síndromes familiares. O conhecimento destas condições genéticas expandiu-se rapidamente devido à identificação dos genes predisponentes, incluindo *MEN1*, *MEN4*, *PRKAR1A*, *CDKN1B* e *AIP*, mas há pouca evidência de que as mutações destes genes sejam também comuns nos tumores esporádicos.

Se de facto tem havido um significativo progresso na caracterização da base molecular da formação tumoral hipofisária, a evidência actual não aponta para que alguma destas alterações seja o evento 'primário' responsável pelos tumores esporádicos. Mutações nos genes de supressão tumoral e oncogenes não têm um papel importante na maioria dos tumores. Contudo, o silenciamento dos genes associado à metilação, em particular de genes de supressão tumoral, foi descrito por diversos investigadores. Diversos genes (ex. PTTG, Pdt-FGFR4, GADD45G, MEG3A, ZAC, DAP cinase, PTAG e p27) têm sido implicados como envolvidos na indução da tumorigénese hipofisária, sendo que o PTTG (securina) parece estar relacionado com a invasibilidade e a agressividade. As alterações da sinalização celular foram identificadas nos tumores da hipófise, mas a sua base genética é desconhecida. Ambas as vias PI3K/Akt/mTOR e Raf/MEK/ERK estão sobre-expressas em muitos tumores da hipófise, resultando na inibição dos inibidores do ciclo celular, como as vias da β -catenina e do HIF. Estas vias podem partilhar uma via comum em diversas fases, incluindo a via inicial da activação relacionada com o receptor da cinase da tirosina, como também com interacções com reguladores a jusante, incluindo c-myc ou a ciclina D1. Para uma proporção significativa de tumores da hipófise, os defeitos moleculares não estão esclarecidos, e mais genes de susceptibilidade virão, com muita probabilidade, a ser identificados. Espera-se que as abordagens da genética, genómica, epigenómica e biologia moleculares modernas, venham a revelar novos mecanismos da indução tumoral endócrina, com o objectivo de melhorar o seu diagnóstico, o prognóstico e as formas terapêuticas.¹⁶⁴

Microarrays de ARN e proteómica

A tecnologia dos *microarrays* (micromatrizes de análise genética) permitiu a quantificação da expressão de um perfil de milhares de genes em simultâneo, tendo levado a novas descobertas no que diz respeito aos tumores da hipófise. Um estudo de Ruebel *et al.* ao

tentar verificar quanta seria a diferença entre os adenomas e os carcinomas da hipófise, mostrou que 4.298 genes eram expressos de forma diferente entre eles, com 2.057 genes sobre-expressos e 2.241 sub-expressos nos adenomas.³⁵⁰

Um estudo pioneiro de *microarrays* de ADN complementar, indicou que 128 dos 7.025 genes examinados tinham uma diferente expressão nos adenomas relativamente à hipófise normal. A análise mais recente realizada por Evans *et al.* focou-se na patogénese molecular dos prolactinomas humanos tendo identificado 726 genes únicos, que eram estatisticamente diferentes entre os prolactinomas e a hipófise normal, e a análise proteómica identificou quatro diferentes proteínas sobre-expressas e 19 sub-expressas.³⁵¹

A β -catenina é um componente *major* da via de sinalização de *Wingless* (Wnt) e um factor importante no desenvolvimento hipofisário. A sua activação regula a função dos eixos hipofisários somatotrofo, mamossomatotrofo, tirotrofo e gonadotrofo, e regula a expressão/transcrição do Pit-1. Estudos recentes exploraram o possível envolvimento da sinalização da β -catenina no desenvolvimento dos tumores da hipófise: os dados são discordantes e contraditórios, apesar de haver evidência de que alterações na sinalização Wnt/ β -catenina estão presentes nestes adenomas, levando a aberrante activação e transcrição de genes-alvo específicos.³⁵²

Em estudo baseado na análise por *microarray* e proteómica, foram encontradas diversas modificações na expressão de genes envolvidos no desenvolvimento hipofisário nos tumores clinicamente não funcionantes, incluindo uma sobre-regulação do Pitx2, Pitx1, SFRP1 (*secreted frizzled related protein 1*) e TLE2 (*transducin-like enhancer of split 2*), que não só reprimem a β -catenina, como também interagem com Hes1 durante o desenvolvimento neuronal.³⁵³ O mesmo grupo mostrou recentemente que diversos componentes da via *Notch* estavam alterados nos prolactinomas, e que havia uma expressão aumentada do factor de transcrição Pit-1 e da sobrevivência do factor BAG1, mas diminuição da expressão da E-caderina e N-caderina em comparação com a hipófise normal.³⁵⁴ Um grupo Australiano mostrou por *microarray* e PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR), que a expressão de uma série de inibidores da via Wnt [WIF1, SFRP2, frizzled B = SFRP3 (FZDB), SFRP4] estava sub-regulada nos tumores da hipófise, comparativamente à hipófise normal.³⁵⁵

Um estudo recente de *microarray*, de Grossman *et al.*, evidenciou que a expressão de alguns genes estava alterada em subtipos particulares dos tumores da hipófise. Por exemplo, a proteína transmembranar associada aos lisossomas-4-b (LAPTM4B), um novo gene sobre-regulado no carcinoma hepato-celular, estava significativamente sobre-expressa nos corticotrofinomas e nos tumores hipofisários clinicamente não funcionantes. A *Bcl-2-associated athanogene* (BAG1), uma proteína anti-apoptótica encontrada em níveis elevados em cancros humanos, estava significativamente sobre-expressa nos somatotrofinomas e nos prolactinomas, bem como nos tumores clinicamente não funcionantes. Mais, o inibidor da cinase dependente da ciclina p18, e que em situação de delecção induzia hiperplasia e adenomas dos corticotrofos no murino, estava significativamente sub-expresso nos corticotrofinomas humanos.³⁵⁶ Contudo, deve-se referir que variações quantitativas na expressão génica, entre a hipófise normal e amostras de biópsias de adenomas da hipófise, requerem uma interpretação cuidada, uma

vez que o perfil de expressão de populações altamente uniformes nos adenomas é necessariamente diferente da composição de uma mistura de diferentes tipos de células constituintes da hipófise normal.¹⁶³

Quanto a estudos de proteômica são ainda mais escassos. Um estudo do grupo de Grossman *et al.*, detectou 316 proteínas diferentes presentes no tecido hipofisário, dos quais 116 não tinham sido previamente descritas na hipófise humana. Na análise das proteínas por *array* (matriz de análise genética), a proteína de choque térmico 110 (HSP110) e o receptor da bradicinina B2 estavam significativamente sobre-expressos em todos os subtipos de adenomas, enquanto que a cinase src C-terminal (CSK) e a annexin II estavam significativamente sub-expressos em todos os subtipos de adenomas. A análise por imunohistoquímica confirmou estas alterações, mas os resultados foram mais variáveis usando o método *Western blotting*.³⁵⁷ Nos tumores clinicamente não funcionantes, os estudos de proteômica e de transcriptômica demonstraram uma sub-regulação da secretagogina quer a nível da proteína quer do ARN mensageiro.³⁵⁸

Um estudo novo da fosfoproteômica caracterizou 50 locais de fosforilação em 26 proteínas, e que modificações pós-translacionais das proteínas da hipófise humana desempenham um papel importante na regulação das diferentes funções hipofisárias.¹⁶⁴

Estudos recentes de proteômica e análise da rede das vias de sinalização evidenciaram uma associação significativa entre os adenomas da hipófise e disfunção mitocondrial, stresse oxidativo, desregulação do ciclo celular, e alterações da via de sinalização MAPK.³⁵⁹

Esta evidência traz novas perspectivas e maior reforço para a continuação da investigação dos mecanismos moleculares na patogénese dos tumores da hipófise.

As abordagens da biologia molecular moderna devem vir a revelar novos mecanismos de indução de formação tumoral endócrina permitindo o desenvolvimento e melhoria do diagnóstico, do prognóstico e de abordagens de tratamento. Contudo, até ao momento actual, os resultados trouxeram muita informação mas sem um paralelo aumento da compreensão.

Moléculas e vias de sinalização envolvidas na indução tumoral hipofisária: súmula

As vias de sinalização que mais têm sido estudadas na indução tumoral hipofisária são as cascatas: MAPK, AKT, Ras e WNT. Ambas as vias MAPK e AKT estão aumentadas em muitos destes tumores, levando a uma sub-regulação da inibição fisiológica do ciclo celular. Estas vias interrelacionam-se a nível da sinalização intracelular, a nível dos receptores das cinases da tirosina, e de receptores de factores de crescimento, podendo ser um evento precoce na indução tumoral. Apesar de estas vias estarem interligadas, elas têm receptores e vias de sinalização independentes.¹⁹⁶

1. Receptores envolvidos na transformação hipofisária

Receptores cinase da tirosina

Um vasto número de ligandos, tais como FGF2, IGF-1, TGF- α , EGF e VEGF, estão presentes no ambiente das células hipofisárias, normais ou adenomatosas, e actuam através dos seus receptores específicos, que pertencem à classe de proteínas das cinases da tirosina (PRK). O ligando induz a activação do seu receptor, que seguidamente leva a uma cascata de activação das MAP-cinases e vias subsequentes, com transdução do sinal a nível intracelular e até ao nível nuclear.¹⁹⁶

Os factores de crescimento e angiogénicos são moléculas despoletadoras da activação de várias vias de sinalização envolvidas na tumorigénese hipofisária. O FGF2 e FGF4 foram os factores de crescimento melhor estudados parecendo estar envolvidos na progressão tumoral.³⁶⁰

Níveis elevados de factores angiogénicos, tais como o VEGF, foram descritos em doentes com todos os tipos de adenomas da hipófise. Ambas as expressões do FGF2 (bFGF) e do VEGF correlacionam-se com o volume e agressividade do tumor.³⁶⁰ Mais, alguns factores angiogénicos têm elementos que respondem à hipoxia nos seus promotores.

O TGF- α é um dos muitos factores que se liga ao receptor do EGF (EGFR), e está sobre-expresso nos tumores da hipófise.³⁶¹

As células vizinhas, como as células foliculo-estelares, criam um microambiente para os pituicitos pela secreção de uma matriz de factores de crescimento, especialmente EGF e citocinas. O anormal crescimento dos pituicitos é largamente mediado por mecanismos parácrinos em que a interacção EGFR-PTTG desempenha um papel primordial.³⁶²

Uma vez que os factores de crescimento epidérmico e dos fibroblastos estão sobre-expressos nos tumores da hipófise, todos os componentes subsequentes das suas vias de sinalização também se encontram desregulados. A sobre-expressão do substracto do factor de crescimento epidérmico 8 (Eps8) leva a um aumento da activação das vias que induzem proliferação e dos mecanismos anti-apoptóticos nas células hipofisárias pela activação da via da MAPK via ERK, e da PI3K via AKT.^{196,363}

Considerando apenas os factores de crescimento e angiogénicos e seus receptores, parece que as moléculas chave de sinalização relacionadas com os tumores da hipófise são bFGF, VEGF, REK, SDF e Eps8. Estas moléculas podem ser bons candidatos quer para o diagnóstico quer para uma terapêutica dirigida.¹⁹⁶

Receptores acoplados às proteínas G

Os receptores acoplados às proteínas G (GPCRs) respondem a estímulos extracelulares, tais como hormonas, pela interacção com uma proteína G e transdução do sinal através da membrana celular para o interior da célula. Após a activação do GPCR, a subunidade G α liga-se à GTP tornando-se activa e conseqüentemente activando os factores de sinalização a jusante tais como a enzima adenilciclase que leva à síntese de AMPc. As proteínas G activadas interagem com factores de sinalização a jusante de forma a alterar a produção de segundos mensageiros tais como fosfatos de inositol, cálcio e AMPc. Os GPCRs que activam a classe Gi da subunidade G α inibem a produção de AMPc e os que activam a

classe Gs da subunidade G α activam a produção de AMPc. Este, por sua vez, activa as cinases das proteínas dependentes do AMPc, como a cinase da proteína A (PKA). A activação da via PKA é um exemplo da transdução de sinal em cascata que leva a diversos eventos sinalizadores e amplificação intra-celular do sinal original. Por cada molécula activada de GPCR, diversas proteínas G podem ser activadas; cada proteína G pode levar à síntese de muitas moléculas de AMPc, continuando a cascata para PKA e subseqüentes moléculas a jusante.¹⁹⁶

Os receptores acoplados às proteínas G estão largamente envolvidos nas funções das células hipofisárias. A inibição do sinal foi demonstrada em adenomas, particularmente nos somatotrofinomas em que mutações pontuais da Gs α (a acção estimuladora Gs reduz a actividade da GTPase, levando a um aumento do AMPc) resultam na inibição da actividade GTPase da Gs α , activação constitucional do AMPc independente da GHRH acoplada ao seu ligando, activação transcripcional de GH e proliferação dos somatotrofos via uma proteína de ligação ao AMPc (CREB) no promotor da GH.³⁶⁰

A associação entre a activação do oncogene *gsp* (por mutação activadora do gene *GNAS1* no cromossoma 20q13) e o desenvolvimento de somatotrofinomas, mantém-se o mecanismo patogénico melhor conhecido nos tumores da hipófise em humanos. Uma de duas mutações pontuais do *GNAS1* (no resíduo 201 ou 227) foi identificada em cerca de 40% dos somatotrofinomas. Estas mutações resultam em um aumento da resistência guanosino trifosfato (GTP) à ligação da subunidade α das proteínas G (Gs α) à hidrólise, e ao concomitante aumento da actividade da adenilciclase. Em experimentação animal condiciona um aumento da expressão da toxina da cólera, o desenvolvimento da proliferação dos somatotrofos e a hiperplasia hipofisária.¹⁶³ Interessante e inesperado é o facto de não haver diferença entre idade, sexo, duração da doença e características clínicas nos doentes com e sem mutações no *GNAS1*. Apenas se observam ligeiras diferenças entre o volume do adenoma (mais pequenos) e os níveis circulantes de hormona do crescimento (mais baixos), apesar dos níveis de AMPc tenderem a ser superiores nos tumores com mutação.³⁶⁴ As mutações activadoras do *GNAS1* também foram descritas em uma minoria de tumores não funcionantes e de corticotrofinomas, mas não nos prolactinomas.^{365,366}

GHRH e somatostatina

Apesar de alguns tumores apresentarem um receptor da GHRH truncado, não foram, contudo, identificadas alterações constitucionais de activação do receptor.³⁶⁰ A primeira alteração molecular descrita foi uma mutação da proteína G transdutora do sinal do receptor da GHRH. Esta mutação *gsp* inibe o normal processamento do receptor mediado pela glicosilação, maturação, ligação do ligando e sinalização.³⁶⁷

Os tumores da hipófise expressam, heterogeneamente, cinco subtipos de receptores da somatostatina (sstr1-5).³⁶⁰ Em condições normais a somatostatina limita o crescimento celular pela via de sinalização da PI3-AKT. Foi demonstrado que os análogos da somatostatina, octreotido e lanreotido, podem induzir uma acção anti-proliferativa nos tumores por: indução da expressão do gene de supressão tumoral *zinc finger protein*, regulação da apoptose e paragem do ciclo celular (Zac1).¹⁹⁶ Foi ainda sugerido que o efeito

anti-proliferativo pode ocorrer pela sub-regulação do pERK e sobre-regulação do p27 levando à paragem do ciclo celular.³⁶⁸ Os receptores da dopamina e somatostatina foram identificados, sendo futuros alvos no tratamento dos tumores da hipófise. Os compostos quiméricos são candidatos a despoletar vias de sinalização intracelular para a activação da apoptose ou outras funções citostáticas. Assim sendo os compostos híbridos de somatostatina-dopamina poderão vir a induzir apoptose nos tumores da hipófise, pela activação das proteínas G que promovem a fosforilação da *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) e, por circuitos paralelos, com aumento do p53 e redução do Ki-67.³⁶⁹

Gonadoliberina (GnRH)

Os tumores da hipófise expressam quer a gonadoliberina quer os seus receptores. Contudo, e à semelhança dos receptores da TRH e da GHRH, não foram identificadas mutações.³⁶⁰ A GnRH induz a sinalização selectiva dos substractos da via PKC/MAPK.³⁷⁰ Foi demonstrado que as MAPKs (ERK, JNK e p38) não só medeiam as acções hipofisárias da GnRH³⁷¹ como também medeiam as acções apoptóticas e anti-proliferativas da GnRH nas células cancerosas.^{372,373} Parece que há uma sinalização divergente consoante os diferentes substractos da MAPK.³⁷⁰

Parece óbvio que, apesar dos receptores hormonais serem os mesmos na hipófise normal e na que sofreu transformação adenomatosa, a activação de diferentes substractos a jusante e de genes alvo sugere que existem múltiplos níveis de interacções complexas de sinalização intracelular.

Receptores nucleares

Os receptores nucleares não são mais do que factores de transcrição activados pela ligação do seu ligando. Inicialmente, foram classificados como receptores nucleares endócrinos clássicos para as hormonas e receptores órfãos. Esta classe de receptores inclui os *peroxisome proliferator activating receptors* (PPARs) para os ácidos gordos e o receptor do ácido retinóico, entre outros, e que foram recentemente considerados como potenciais alvos terapêuticos nos corticotrofinomas.^{374,375}

O receptor nuclear mais importante é o receptor dos estrogénios, tendo a sua expressão sido demonstrada em todos os subtipos de tumores; em maior grau nos prolactinomas; mas também significativo nos tumores mistos secretores de prolactina e de somatotrofina e nos produtores de gonadotrofinas. Adicionalmente verificou-se que os macroadenomas, especialmente os macroprolactinomas no homem, também têm uma expressão mais elevada destes receptores comparativamente aos microadenomas, podendo explicar as suas características de invasibilidade. Factores alvos de transcrição induzidos pelos estrogénios incluem factores de crescimento (bFGF, VEGF, IGF, EGF e TGF) e proteínas oncogénicas (*c-myc*, *c-fos*, *erb*, *c-myb*, *PTTG*).^{360,376}

Os receptores da progesterona também se encontram expressos nos tumores da hipófise, particularmente na mulher e nos microadenomas. A progesterona é um potente regulador da transcrição da GnRH e do seu receptor; mais, o receptor da progesterona antagoniza o desenvolvimento e a capacidade secretora do tumor.³⁷⁷

O papel destes reguladores da transcrição ainda não foi totalmente determinado sendo possível que desempenhem apenas um papel 'permissivo' na patogénese dos tumores da hipófise.¹⁹⁶

2. Vias de transdução do sinal

Apesar de parecer haver inúmeras vias de sinalização, na verdade existe relativamente pequeno número de vias distintas de transdução dos sinais externos. Estes sinais induzem dois grandes tipos de resposta celular: alterações na actividade ou função de proteínas específicas pré-existentes, e alterações na quantidade de proteínas específicas produzidas pela célula. Geralmente resultam da modificação de factores de transcrição, levando à modelação da transcrição génica. A sinalização decorrente dos GPCRs habitualmente resulta em uma resposta de activação de proteínas pré-existentes, embora algumas células a sua activação também possa induzir alterações na expressão génica.¹⁹⁶

Sinalização PTTG

O *PTTG* reveste-se de importância, uma vez que está envolvido na fisiologia normal celular e na transformação patológica hipofisária.

O gene de transformação tumoral hipofisário é um proto-oncogene envolvido nos tumores da hipófise e em outros tumores.³⁷⁸ Uma das suas funções resultando na facilitação do desenvolvimento tumoral hipofisário, é a indução de um aumento da angiogénese, processo mediado por factores tais como o TGF- α , bFGF, VEGF-A e VEGFR-I e II, que parecem estar associados a uma maior agressividade tumoral.³⁷⁹ A função fisiológica do PTTG é a de actuar como uma proteína de segurança (*securina*) inibindo a separação das cromátides, e por conseguinte regulando a mitose. Por outro lado, tem ainda um papel na reparação do ADN, possivelmente pelo estabelecimento da ligação das vias de resposta à lesão do ADN com a separação das cromátides.³⁸⁰ O evento chave no funcionamento do PTTG é a translocação nuclear despoletada pela fosforilação.^{381,382} Este processo pode envolver as vias MAPK e PI3K ou CDK1, *dsDNA-dependent kinase*. Foi demonstrada a regulação da expressão do PTTG pelos estrogénios. A maioria dos tumores da hipófise expressa níveis elevados de receptores de estrogénios e de PTTG; assim sendo, uma terapêutica anti-estrogénica de futuro poderá suprimir a expressão do *PTTG* e reduzir a agressividade do tumor.³⁸³

O gene de transformação tumoral hipofisário está envolvido na estabilidade cromossómica pela inibição da separase (*ESPL1*, proteína *caspase-like*) na mitose³⁸⁴ e sub-regulação da via apoptótica p53.^{385,386}

A sobre-expressão do *PTTG* nos tumores da hipófise, foi relatada a nível do ARNm há cerca de duas décadas, dado que a imunohistoquímica frequentemente (>90%) revelava a sua expressão citoplasmática elevada.¹⁹⁶

Vários estudos investigaram uma potencial correlação entre a expressão de *PTTG* e os diferentes tipos de tumores da hipófise, assim como o seu valor preditivo.^{378,380,387}

Verificou-se uma expressão significativamente mais elevada nos somatotrofinomas relativamente aos tumores não funcionantes,^{378,380} no entanto tal não se verificou em

relação aos tumores secretores de TSH, ACTH, prolactina e gonadotrofinas (apesar daqueles terem uma expressão maior, mas não significativa); sendo assim os níveis de PTTG não fazem a distinção entre os diferentes subtipos de tumores secretores.³⁷⁸

O efeito do *PTTG* na proliferação celular ainda não está completamente esclarecido. Na sua capacidade funcional de securina, espera-se que a sobre-expressão de *PTTG* reduza a proliferação celular, pela paragem das mitoses e inibição da separação das cromátides; na sua função de oncogene de transformação celular, poder-se-á esperar uma acção pró proliferativa.¹⁹⁶ A correlação entre a expressão de *PTTG* e a proliferação celular tem sido demonstrada em diversos estudos clínicos.³⁸⁷ A expressão do seu ARNm nos tumores secretores, está significativamente aumentada nos invasivos mas não nos clinicamente não funcionantes, onde não se correlacionou com o estágio do tumor.³⁸⁰

Alguns autores indicam que existe uma correlação entre *PTTG* e factores angiogénicos, tais como bFGF e VEGF. A expressão de EGF induzida pelo *PTTG* está associada a um aumento da proliferação celular, níveis elevados de antigénio nuclear de proliferação celular e aumento da entrada das células para a fase S.³⁶² A correlação entre *PTTG* e a expressão de VEGF/VEGFR2 foi demonstrada, bem como a co-localização de *PTTG* e VEGF. Considerando a correlação entre os factores angiogénicos e o aumento da densidade microvascular, é de presumir a implicação do *PTTG* nas funções angiogénicas e de proliferação celular.³⁸⁸

Poder-se-á concluir que o *PTTG*, uma vez que está correlacionado com factores angiogénicos, componentes do ciclo celular e eventos de proliferação, poderá estar associado a características de agressividade e invasibilidade, representando um bom biomarcador molecular intracelular.¹⁹⁶

Cinases das proteínas

Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

As cinases activadoras das proteínas mitogénicas são importantes intervenientes nas vias de transdução do sinal. São activadas por um vasto leque de estímulos e medeiam um número importante de funções celulares fisiológicas e patológicas. A via MAPK representa a cascata de ligação da sinalização de crescimento e diferenciação, com a transcrição. Os receptores de factores de crescimento e as cinases da tirosina activam a Ras, que por sua vez activa a c-Raf, MEK e MAPK. A MAPK modela sinais de transdução intermediários entre os receptores das cinases da tirosina e a sinalização nuclear a jusante.¹⁹⁶ A activação da MAPK está envolvida nos efeitos tumorigénicos da TRH, GnRH e GHRH,^{389,390} nestes casos não é o desencadeador mas a ponte entre os eventos primários e a sinalização a jusante (nuclear). Por conseguinte, a via MAPK pode ser considerada como uma rede fulcral e altamente sensível para a detecção de moléculas que induzem transformação tumoral, e de potenciais alvos terapêuticos, uma vez diversos inibidores desta via poderão ter um papel importante no tratamento dos diferentes subtipos dos tumores da hipófise.^{196,368,391}

PKA e PKC

Ambas as vias, AKT (também conhecida como PKB) e MAPK estão sobre-expressas em diversos tumores da hipófise, resultando na inibição dos inibidores do ciclo celular. Estas vias partilham uma raiz comum, o receptor da cinase da tirosina; alterações deste receptor

ou na sua relação com a matriz de proteínas relacionadas com ele podem ser eventos precoces na indução tumoral.³⁹¹

A cinase da proteína A, da PKC e da PKB são críticas para a regulação da actividade de muitas proteínas celulares, habitualmente em resposta a estímulos externos. Todas estas cinases das proteínas foram encontradas como envolvidas na transformação tumoral hipofisária.¹⁹⁶

PI3K-AKT

Muitos receptores da superfície celular ao serem activados induzem um segundo mensageiro, como o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que converte o sinal para o citoplasma. A sinalização PIP3 activa a cinase PDK1 (*kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*), que por sua vez, activa a cinase AKT. As proteínas fosforiladas pela AKT activada promovem a sobrevivência celular e opõem-se à apoptose por uma variedade de vias.¹⁹⁶

A sinalização através da família PI3K, ao promover a proliferação e sobrevivência celular, leva a que a expressão da PI3K esteja fortemente associada com a transformação tumoral e metástases. Um aumento da expressão do ARNm da PI3K foi referido nos tumores da hipófise.^{360,392}

A activação anormal da via PI3K é um passo essencial para a iniciação e manutenção dos tumores, podendo resultar de distintos ou complementares eventos biológicos incluindo: mutações constitucionais activadoras ou amplificadoras dos receptores das cinases das tirosinas (levando a um recrutamento e activação da PI3K e dos efectores a jusante); amplificação da PI3K; presença de mutações activadoras no gene *PIK3CA* codificador da subunidade p110 α catalítica; sobre-expressão da cinase AKT a jusante; perda ou mutações inactivadoras do gene de supressão tumoral *PTEN*, um regulador endógeno negativo da via PI3K; recrutamento constitucional e activação de formas mutantes do oncogene Ras.³⁹³

Só em 2008 houve forte evidência genética do envolvimento da via de sinalização PI3K-AKT na tumorigénese hipofisária, particularmente nos tumores invasivos,³⁹⁴ pelo que o número de trabalhos nesta área ainda é escasso.

Ras

Alguns oncogenes clássicos, como o *RAS* e *MYC*, estão envolvidos nestes tumores. Contudo, a activação *Ras* é rara; as mutações *H-Ras* apenas foram identificadas num único prolactinoma agressivo e em metástases de carcinomas hipofisários, mas não no tumor primário.³⁶⁰

Vias WNT/ β -catenina

As vias *major* envolvidas no desenvolvimento da hipófise incluem as vias de regulação Notch e Wnt, que são principalmente activas nas fases precoces da organogénese hipofisária e são essenciais para o desenvolvimento dos somatotrofos, lactotrofos e tirotrofos.³⁹⁵

A sinalização Wnt inclui três diferentes vias: a via canónica Wnt/ β -catenina; a via não canónica Wnt/c-Jun N-terminal Kinase (JNK) e a via não canónica Wnt/Ca²⁺. A activação

aberrante da via Wnt/ β -catenina é uma das alterações mais frequentes no cancro humano.¹⁹⁶

Recentemente foi descrita uma sobre-expressão das proteínas Wnt em diversos cancros humanos, mas alterações da sua expressão não foram frequentemente descritas nos adenomas da hipófise.¹⁹⁶

A via de sinalização da β -catenina na indução tumoral hipofisária ainda é matéria de debate científico. A β -catenina é importante no desenvolvimento da hipófise, controlando a expressão e transdução de numerosos factores de transcrição e de genes alvo seleccionados. Esta via também parece ser um regulador *major* da função hipofisária através da transcrição/transdução de genes específicos controladores da secreção hormonal, particularmente da linhagem gonadal.³⁴⁵ Componentes da via da β -catenina são detectados em tumores da hipófise, estando esta via anormalmente activada. Os adenomas hipofisários evidenciam uma redução da expressão da β -catenina e, em particular, do complexo E-caderina/catenina nos tumores agressivos secretores de GH e de prolactina.¹⁹⁷

Factor inibidor-1 Wnt

A via de sinalização Wnt/ β -catenina pode ser inibida por diferentes antagonistas endógenos [Wnt inhibitory factor-1 (WIF1), sFRP2, sFRP3, sFRP4], entre os quais o WIF1 que ao ligar-se aos ligandos Wnt, previne a activação dos receptores.³⁹⁶

Recentemente foi demonstrado que diversos inibidores da via Wnt estavam sub-regulados a nível do ARNm, nos adenomas funcionantes e nos não funcionantes. A imunohistoquímica evidenciou uma sub-expressão WIF1 que deve ser precoce, pois está presente em todos os subtipos de tumor. Posteriormente, outros eventos genéticos ocorrerão, explicando as diferenças de comportamento observada em cada um destes.^{396,397}

A activação da β -catenina regula o funcionamento dos eixos somatotrofo, mamossomatotrofo, tirotrofo e gonadotrofo, e regula a expressão e transcrição do *Pit-1*. A via da Wnt/ β -catenina também induz a transcrição do *Pitx2*, que activa genes reguladores do crescimento (ex. *ciclina D1*, *ciclina D2* e *c-Myc*) necessários à proliferação de células específicas.³⁴⁵

Uma interacção entre as vias de sinalização de Wnt/ β -catenina e do FGFR, foram também referidas.¹⁹⁶

A via Wnt/ β -catenina compreende moléculas sinalizadoras, promissoras como armas de diagnóstico especialmente para a detecção de tumores mais agressivos. Os inibidores Wnt poderão ser de valor, num painel de moléculas sinalizadoras, para a caracterização dos diferentes subtipos de tumores da hipófise.¹⁹⁶

Factores de transcrição

O factor de transcrição específico hipofisário 1 é um factor envolvido na diferenciação dos fenótipos lactotrofo, somatotrofo e tirotrofo durante o desenvolvimento da hipófise anterior. Nos somatotrofinomas a sub-regulação do *Pit-1* é mediada pela via PI3-AKT e

governa a sobrevivência celular. A GHRH é capaz de activar a via PI3-AKT e regular a transcrição do Pit-1.³⁹⁸

A presença do *pituitary homeobox factor 1* (Ptx1), descrito como um activador da expressão do gene da pró-opiomelanocortina, foi demonstrada em todas as células hipofisárias normais e na maioria dos subtipos de adenomas. Nestes verificou-se uma redução da sua expressão, mas sem alterações da transactivação da expressão do factor Prop-1.³⁹⁹

Em resumo, nas vias de sinalização intracelulares a molécula *major* envolvida na tumorigénese hipofisária é o PTTG, que está ligado a uma rede intrincada de hormonas e de factores de crescimento. Há um aumento de evidência que suporta um papel multifuncional do *PTTG1* na fisiologia celular e na tumorigénese. Os mecanismos de formação tumoral resultantes da acção do PTTG, envolvem transformação celular, aneuploidia, apoptose, angiogénese e retrocontrolo do microambiente tumorigénico. Atendendo ao seu papel central pode ser definitivamente considerado um marcador de diagnóstico. Componentes da via Wnt/ β -catenina também parecem ser moléculas chave na caracterização dos tumores, como atrás descrito.¹⁹⁶

Ciclo celular

O ciclo celular é regulado pela interacção de diversas moléculas. Entre estas estão as ciclinas, que são expressas e degradadas de forma concertada, dirigindo as fases do ciclo celular. As ciclinas conjuntamente com as CDKs formam cinases activadas que fosforilam os alvos que levam à regulação do ciclo celular. Uma quebra na regulação deste ciclo pode levar a um crescimento fora de controlo e à formação tumoral. Defeitos em muitas destas moléculas foram implicados na carcinogénese. Entre estas temos algumas importantes, como são exemplo o p53, as inibidoras das CDKs (p15, p16, p18, p19, p21 e p27) e Rb, todas elas actuando de forma a atrasar o ciclo celular, até à reparação do ADN lesado. Entre as diferentes cinases, as CDKs e seus inibidores são reguladores críticos da transição das diferentes fases do ciclo celular. Da revisão da literatura, ressaltam as ciclinas e a proteína do retinoblastoma como mais relevantes para a génese dos adenomas da hipófise.^{196,400}

Ciclinas

A imunohistoquímica para a expressão da proteína ciclina D1 não comprovou o aumento da sua expressão face ao desequilíbrio alélico do gene *D1* do ciclo celular, descrito em cerca de um quarto dos tumores; o significado deste achado não é claro. A metilação dos exões para o inibidor CDK, *p16*, foi referido na maioria dos tumores da hipófise. Outro estudo evidenciou a metilação do gene *p16/CDKN2A* na maioria dos tumores não funcionantes e em 9,5% dos somatotrofinomas.³⁶⁰ A ablação genética do *p16INK4a* e do *p18INK4c* parece cooperar no desenvolvimento dos tumores.⁴⁰¹ Estes modelos sugerem uma relevância das vias CDK (e seus inibidores INK4 ou KIP) e pRb na indução tumoral hipofisária.⁴⁰⁰

Proteína associada ao retinoblastoma

Diversos estudos de imunodeteção mostraram uma expressão anormal da pRb em diferentes tumores da hipófise. Em alguns casos, a diminuição da sua expressão correlaciona-se com mecanismos epigenéticos, nomeadamente hipermetilação do promotor do Rb ou deleções do domínio de ligação às proteínas.^{360,400} A proteína mostrou estar ligada ao *PTTG* podendo levar a uma sobre expressão do *PTTG1* e hiperplasia hipofisária, microadenomas focais e maior incidência de tumores no modelo animal.⁴⁰² A perda do gene de supressão tumoral Rb está ligada a maior agressividade tumoral e a perda da expressão da proteína em um quarto dos tumores secretores de GH.⁴⁰³

Proteína p27

A proteína p27 regula a progressão do ciclo celular na fase G1. A diminuição da sua expressão tem sido descrita em adenomas da hipófise comparativamente ao tecido hipofisário normal.³⁶⁰

Dados recentes sugerem a existência de duas vias principais para a desregulação da fase G1/S nos tumores da hipófise. Uma é a p18INK4c/CAKE/pRb e outra p27Kip1 e provavelmente p21Cip1.

O estudo destas vias deverá fornecer informação importante quer no diagnóstico quer na orientação para alvos terapêuticos.⁴⁰⁰

Concluindo, poder-se-á dizer que muitos dos aspectos da génese tumoral hipofisária estão ainda por identificar, mas que se começam a desvendar alguns dos componentes deste complexo labirinto. Existe uma inter-relação entre os factores do microambiente e as células hipofisárias que leva à transformação tumoral, um processo que pode ser modelado a diferentes níveis. As vias de sinalização que se iniciam com os receptores do crescimento, factores angiogénicos e hormonas iniciam circuitos intracelulares que, a nível genético, desregulam a proliferação e a apoptose.

Factores de crescimento e angiogénicos e seus receptores relacionados com a transformação hipofisária, têm moléculas de sinalização chave que podem ser boas candidatas para o diagnóstico e terapêuticas alvo.

Hormonas e receptores específicos têm componentes da via PI3/AKT que são alvo para os análogos da somatostatina, podendo desempenhar um importante papel no tratamento médico destes tumores.

O gene de transformação hipofisário (*PTTG*) está associado com o subtipo de tumor, a sua agressividade e invasibilidade, tornando-o um bom biomarcador intracelular.

A via Wnt/ β -catenina parece ser promissora na detecção da agressividade do tumor, enquanto que os inibidores da Wnt podem contribuir com um painel de moléculas de sinalização para identificação dos diferentes subtipos.

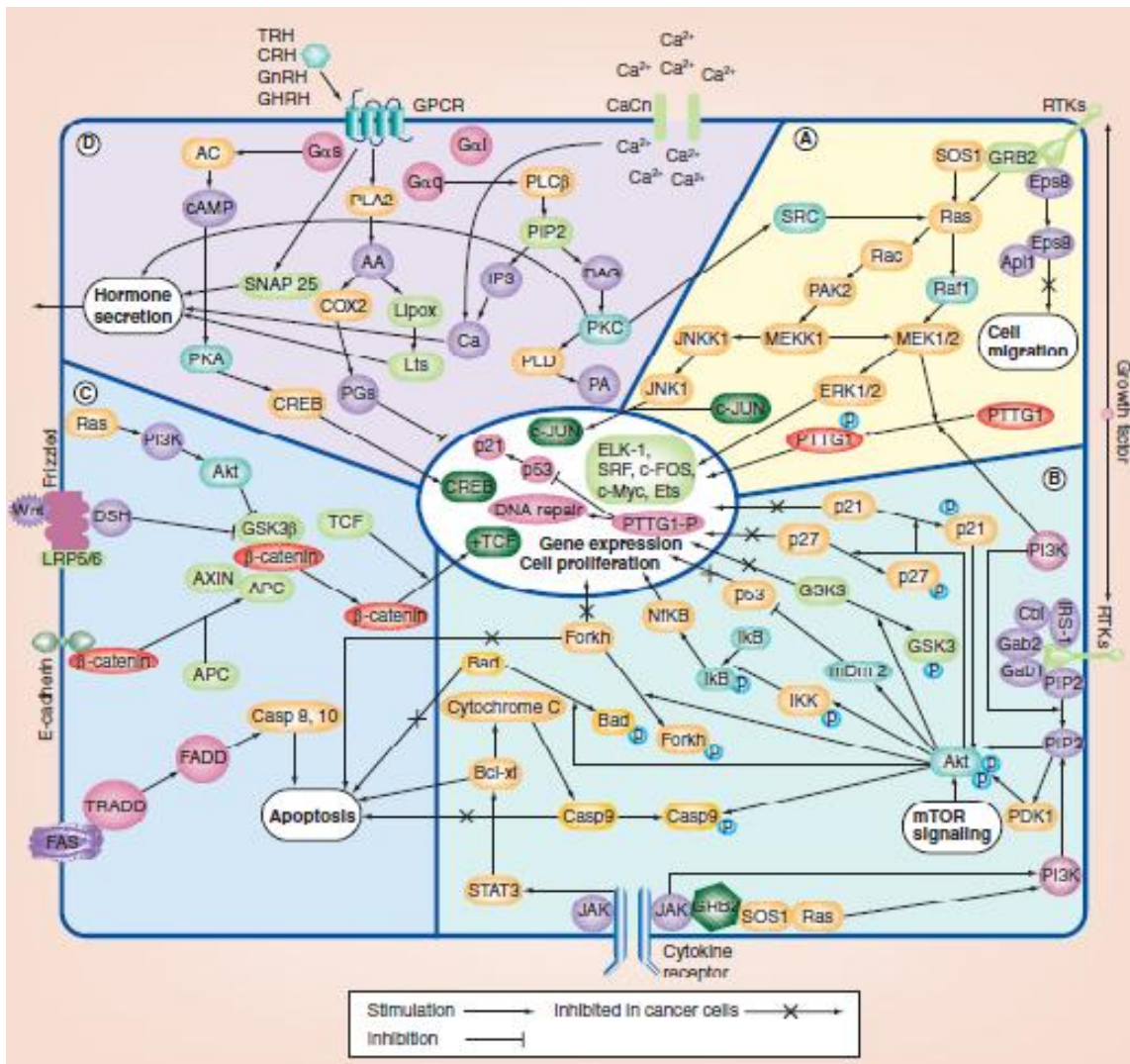
Na transformação tumoral, as vias do ciclo celular CDK4/pRb são importantes para o diagnóstico ou terapêuticas alvo.

Uma vez que os tumores da hipófise se caracterizam por uma hiperactividade das vias AKT e MAPK são, definitivamente alvos para a inibição mediada pelos análogos da somatostatina.

Linhas de investigação apontam para uma aplicação clínica significativa do *PTTG1* na correlação com um fenótipo de agressividade e de taxa de sobrevivência, e classificam-no como um candidato interessante para a avaliação da malignidade, determinação do estágio do tumor e um biomarcador para posteriores intervenções terapêuticas.

Estudos futuros são necessários para melhor compreensão e conhecimento dos mecanismos moleculares da transformação tumoral e para o esclarecimento do papel das moléculas de sinalização intracelular como marcadores de diagnóstico e de prognóstico ou como alvos de novas terapêuticas.¹⁹⁶

Na figura seguinte está representada, de forma esquemática, a complexidade dos principais processos e das principais vias de sinalização envolvidas na formação tumoral hipofisária.



Vias de sinalização principais no processo de formação tumoral hipofisária: (A) Via dos factores de crescimento dos receptores da cinase da tirosina (RTKs) ligada à migração celular via Eps8 ou via Ras para activação de oncogenes. (B) Via de factores de crescimento RTKs via PI3K e rede Akt que inibem a apoptose. (C) Via Wnt/β-catenina na qual os membros da família Wnt se ligam aos receptores *frizzled* induzindo a expressão TCF. O PTTG liga diversas vias intra-celulares reguladoras da reparação do ADN e do ciclo celular via p53. (D) Hormonas que se ligam aos receptores acoplados às proteínas G (GPCR) e que mediados pela subunidade Gα, podem induzir a secreção hormonal e a expressão do elemento de ligação de resposta ao AMPc (CREB). Figura de Tanase CP, Neagu M, Albulescu R. *Key signaling molecules in pituitary tumors*. Expert Ver Mol Diagn 2009;9:859-877.

Na tabela seguinte estão elencadas as alterações que têm sido descritas em proto-oncogenes e genes de supressão tumoral envolvidos nas moléculas e vias de sinalização atrás mencionadas.

Gene	Defeito molecular	Tumor da hipófise
RB1	Metilação do promotor, perda do 13q14, sub-expressão do Rb	Vários tumores da hipófise, crescimento invasivo
Ciclina D1 (CCND1)	Desequilíbrio alélico, sobre-expressão	Somatotrofinomas, tumores não funcionantes, crescimento invasivo
Ciclina D3 (CCND3)	Sobre-expressão	Vários tumores da hipófise
Ciclina E (CCNE)	Sobre-expressão	Corticotrofinomas
Ciclina A (CCNA1)	Sobre-expressão	Vários tumores da hipófise
p15Ink4b (CDKN2B)	Metilação do promotor, sub-expressão	Vários tumores da hipófise
P16Ink4a (CDKN2A)	Metilação do promotor, sub-expressão	Vários tumores da hipófise
P18Ink4c (CDKN2c)	Sub-expressão	Vários tumores da hipófise
P21cip1a (CDKN1a)	Sub-expressão Sobre-expressão	Tumores não funcionantes Vários tumores da hipófise
PTTG	Sobre-expressão	Vários tumores da hipófise, crescimento invasivo
ZAC1	Metilação do promotor, sub-expressão	Tumores não funcionantes
GADD-45	Metilação do promotor, sub-expressão	Vários tumores da hipófise
Pdt-FGFR4	Iniciação de transcrição alternativa, sobre-expressão	Vários tumores da hipófise, crescimento invasivo
FGFR2	Metilação do promotor, sub-expressão	Vários tumores da hipófise
MAGE-A3	Hipometilação, sub-expressão	Vários tumores da hipófise
BMP-4	Sub-expressão	Prolactinoma
EGFR	Sobre-expressão	Corticotrofinomas
PKC	Sobre-expressão, mutações pontuais	Crescimento invasivo
PIK3CA	Mutações somáticas, amplificação génica	Crescimento invasivo
RAS	Mutações pontuais, amplificação génica	Crescimento invasivo
WIF-1	Metilação do promotor, sub-expressão	Vários tumores da hipófise
MEG3a	Metilação do promotor, sub-expressão	Tumores não funcionantes
PTAG	Metilação do promotor, sub-expressão	Vários tumores da hipófise
FR	Sobre-expressão Sub-expressão	Tumores não funcionantes Prolactinomas, somatotrofinomas
CMPtk	Sobre-expressão Sub-expressão	Corticotrofinomas Prolactinomas
ODC	Sobre-expressão Sub-expressão	Somatotrofinomas Corticotrofinomas
LAPTM4B	Sobre-expressão	Tumores não funcionantes Corticotrofinomas
BAG1	Sobre-expressão	Vários tumores da hipófise
GNAS	Mutações inactivadoras, <i>imprinting</i> materno	40% dos somatotrofinomas, MAS
MEN1	Mutações inactivadoras, sub-expressão	Todos os tipos de tumores da hipófise
P27 ^{kip1b} (CDKN1B)	Mutações germinais <i>nonsense</i> Sub-expressão	Síndrome MEN1-like Tumores esporádicos
PRKAR1	Mutações germinais	Hiperplasia somatotrófica e adenomas no CNC
AIP	Mutações germinais e LOH	15% dos FIPA e raramente em tumores esporádicos, agressividade

Adaptado de Vandeva S, Jaffrain-Rea ML, Daly AF, et al. *The genetics of pituitary adenomas*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2010;24:461-476.

3. Tumores da hipófise clinicamente não funcionantes

3.1. Conceito e epidemiologia

Os tumores da hipófise clinicamente não funcionantes englobam um conjunto vasto de tumores, desde os verdadeiramente não secretores, em que bioquímica e histologicamente não há evidência de expressão hormonal, os 'silenciosos' em que histologicamente há marcação hormonal mas clinicamente não há evidência de hiperprodução hormonal, até aos secretores mas em que a clínica é muito fruste e que são constituídos, maioritariamente, pelos designados gonadotrofinomas. Representam cerca de um terço de todos os tumores da hipófise e muitas vezes só incidentalmente são diagnosticados. O diagnóstico precoce, a capacidade de prever o seu comportamento biológico a longo prazo e o seu tratamento constituem um desafio ao endocrinologista e à equipa multidisciplinar que trata e segue estes doentes.

A maioria é esporádica embora raramente possam estar enquadrados em síndromes familiares ou em contexto familiar. São assim designados uma vez que não produzem hormonas, ou se o fazem, a sua produção é subtil ou biologicamente ineficaz. Apresentam-se na quase totalidade como macroadenomas e o seu seguimento a longo prazo impõe-se para o diagnóstico e tratamento do hipopituitarismo, disfunção visual e eventual recidiva ou progressão do tumor.⁴⁰⁴

A definição dos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes é essencialmente clínica, indicando a ausência de sintomas e sinais secundários à hipersecreção pelo tumor. No entanto alguns sintetizam gonadotrofinas ou subunidades de gonadotrofinas.⁴⁰⁵ A sua incidência exacta é difícil de definir e depende do método de avaliação. Uma meta-análise englobando estudos de autópsia e de radiologia encontrou uma prevalência de 16,7%.⁴⁰⁶ Em estudo recente de uma série de 3.048 autópsias, foram detectados tumores da hipófise em 10,5% dos casos, 39% dos quais eram não funcionantes.⁴⁰⁷ Em Stoke-on-Trent foram encontrados 19 a 28 casos de tumores da hipófise por 100.000 habitantes, dos quais 7 a 9 por 100.000 eram não funcionantes.⁴⁰⁸ Na Bélgica a prevalência descrita foi superior de 94 por 100.000, sendo 14,7% dos casos não funcionantes.⁴⁰⁹ Finalmente, os tumores clinicamente não funcionantes em séries cirúrgicas representam cerca de 50% dos tumores da hipófise.⁴¹⁰ Na casuística do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC, EPE, e de forma aproximada, estes tumores representarão cerca de 35% a 40%, dos tumores operados.

3.2. Classificação e histopatologia

Os tumores da hipófise clinicamente não funcionantes podem ser divididos, com base nas suas características estruturais e imunohistoquímicas, em: gonadotrofinomas, tumores

silenciosos (subtipos 1, 2 e 3), tumores de células nulas, oncocitomas (variante dos tumores de células nulas), e não classificáveis.^{167,404,411} Os gonadotrofinomas, os tumores de células nulas e os oncocitomas representam cerca de 85% dos tumores não funcionantes operados e 15% os restantes.⁴⁰⁴ Os avanços no conhecimento das vias de diferenciação celular das células hipofisárias e o uso de marcadores citogenéticos tem, no entanto, modificado e aperfeiçoado esta classificação tornando-a mais precisa.

Estes tumores apesar de não evidenciarem expressividade clínica sob o ponto de vista hormonal frequentemente expressam positividade para diferentes hormonas nos estudos imunohistoquímicos e o seu diagnóstico é efectuado apenas com base nas suas características morfológicas. Alguns autores aceitam que possa haver um *continuum* entre os adenomas completamente funcionantes (tumores activos com alterações bioquímicas e um fenótipo clínico típico) e os completamente silenciosos (tumores sem sinais clínicos e laboratoriais).⁴¹² Compreendem um grupo heterogéneo de tumores havendo no entanto evidência de que a maioria, senão quase a totalidade, terá como origem a célula gonadotrófica.⁴¹¹ O seu diagnóstico requer uma classificação precisa para melhor caracterização e previsão do seu prognóstico. Embora só raramente apresentem evidência clínica e bioquímica de excesso hormonal na verdade eles produzem FSH ou LH e expressam α -subunidade, β -FSH e β -LH bem como factores de transcrição associados à diferenciação dos gonadotrofos. Curiosamente, existe uma correlação entre os níveis séricos das gonadotrofinas pré-operatórias e a sua libertação, *in vitro*, em células de cultura de tecidos removidos cirurgicamente de doentes com tumores clinicamente não funcionantes. Isto sugere que apesar de não ser clinicamente relevante, a libertação bioquímica detectável de gonadotrofinas está presente em alguns casos.⁴¹³ Verificou-se ainda que havia um predomínio da secreção de FSH relativamente à LH, quer *in vitro* quer *in vivo*.

Ocasionalmente adenomas clinicamente silenciosos são positivos para o factor de transcrição Pit-1 e para as hormonas GH, PRL, β -TSH sendo classificados de acordo com a sua origem e qualificados como 'silenciosos' (somatotrofinoma silencioso, prolactinoma silencioso, tirotrofinoma silencioso). Entre os tumores silenciosos, os corticotrofinomas silenciosos são os mais frequentes; estes manifestam imunorreactividade para o factor de transcrição Tpit e para a ACTH. Microscopicamente, o subtipo 1 é morfológicamente indistinguível dos corticotrofinomas clássicos funcionantes; o subtipo 2 consiste em células mais pequenas e mais escassamente granulares; o subtipo 3 caracteriza-se tipicamente por uma população de células fusiformes. Este subtipo é o que predomina nos tumores clinicamente não funcionantes silenciosos. Têm sido considerados como tendo um comportamento biológico mais agressivo do que outros adenomas silenciosos e com invasão mais frequente dos seios cavernosos. No entanto, a indicação de um tratamento mais agressivo, é uma questão que permanece por estabelecer. Os corticotrofinomas silenciosos ocasionalmente são silenciosos em termos de sintomas e sinais clínicos óbvios, mas podem ser detectados em provas sensíveis de rastreio, tais como o cortisol sérico às vinte e quatro horas ou a resposta à frenação com baixas doses de dexametasona. Estes casos foram designados por Besser de 'sussurrantes' (*whispering pituitary adenomas*).⁴¹⁴ O

seu significado ainda permanece por esclarecer. É também de referir que tumores silenciosos com imunopositividade se podem tornar clinicamente funcionantes em episódios de recorrência. Isto foi descrito para os casos de ACTH, GH e TSH.⁴¹² Há várias teorias para justificar que os corticotrofinomas não libertem a ACTH: defeito celular na libertação; armazenamento inadequado no complexo de Golgi; células derivadas da *pars intermédia*; secreção preferencial de moléculas biologicamente inactivas; alterações translaccionais ou pós translaccionais da ACTH (na conversão da pró-hormona).

Os tumores raros, completamente negativos para todas as hormonas e factores de transcrição, são classificados como tumores de células nulas. Estes habitualmente comportam-se como os gonadotrofinomas; apesar de serem negativos para as gonadotrofinas geralmente exibem coloração para o factor esteroideogénico-1 (SF-1) que é específico da linhagem gonadotrófica.

Os oncocitomas são tumores maioritariamente compostos de oncocitos que são frequentemente gonadotrofos ricos em mitocôndrias. Os oncocitos são células caracterizadas pelo aumento do número e da densidade volumétrica mitocondrial. As características imunohistoquímicas e ultraestruturais são semelhantes às das dos tumores de células nulas, excepto a abundância em mitocôndrias.^{167,411}

À medida que os marcadores imunohistoquímicos vão sendo mais precisos o número de tumores não classificados vai diminuindo. A plurihormonalidade, que era muito comum no passado, tem vindo a decair com a maior precisão do diagnóstico.

Vias oncogénicas

Estas vias foram já anteriormente desenvolvidas e apenas se faz uma breve referência ao que mais estará ligado a este subtipo de tumores da hipófise. As vias oncogénicas que podem estar envolvidas nos tumores clinicamente não funcionantes vão desde sub-expressão de genes de supressão tumoral até uma sobre-expressão de oncogenes. Entre estes e suas vias destacam-se: o *PTTG*,⁴¹⁵ e as vias fosfatidilinositol cinase/proteína cinase B (Akt);⁴¹⁶ a expressão de uma forma truncada do receptor do factor de crescimento dos fibroblastos-4.⁴¹⁷ Mais recentemente foram identificadas outras duas vias oncogénicas: a via Ras-BRAF-*mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e a via de sinalização Wnt.⁴¹¹ A via MAPK é regulada pela cinase serina/treonina, B-RAF, cujas funções tem um efector a jusante Ras interposto entre o receptor da cinase da tirosina e a via MAPK. As mutações do gene BRAF têm sido descritas na maioria dos melanomas malignos e em uma minoria substancial de carcinomas papilares da tiróide. Alguns autores não encontraram mutações BRAF nos tumores esporádicos da hipófise, mas observaram uma significativa sobre-expressão deste gene, quer a nível do ARN quer a nível da sua proteína, particularmente nos tumores clinicamente não funcionantes.⁴¹⁸ A sobre-expressão da via BRAF pode ser uma característica dos tumores hipofisários clinicamente não funcionantes, evidenciando uma hiper-reatividade da via Ras-BRAF-MAPK. Dados preliminares do que se passa a jusante do BRAF sugerem uma sobre-expressão do sinal extra-celular activado regulado pela cinase 1/2 (ERK1/2).⁴¹¹

A via de sinalização Wnt tem sido implicada em diversos tumores, nomeadamente também na hipófise.^{419,420,421,422} Na via clássica, o Wnt liga-se ao seu receptor, um receptor heterodimérico complexo, o *Frizzled-lipoprotein-related protein (LPR) receptor*, que resulta na estabilização da β -catenina, que por sua vez sofre translocação para o núcleo onde regula a transcrição de diversos genes alvo (factores de transcrição), levando em último lugar à proliferação celular. Proteínas antagonistas da Wnt são segregadas inibindo a ligação do Wnt ao complexo *frizzled-LPR*. Um destes antagonistas é a *frizzled related protein* (sFRP-3), também conhecida como *Frizzled B and Wnt inhibitory factor 1* (WIF1). A dessensibilização da via WIF1 pelo silenciamento epigenético foi descrita em alguns tumores. Em estudo recente de *microarray* foi identificada uma redução na expressão tumoral de ARNm de WIF1, sFRP2 e sFRP4.⁴²³ Estes resultados suportam os dados iniciais de sobre-expressão da via Wnt/ciclina D1 nos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes e nos mais agressivos;⁴²⁴ uma nova via foi igualmente identificada na tumorigénese dos tumores clinicamente não funcionantes, a via MEG3 (*maternally expressed gene 3*).⁴²⁵ O gene MEG3 localizado no 14q32.3 é um gene de *imprinting* que codifica um ARN não codificante, que suprime o crescimento celular. Contudo, a perda da expressão do MEG3 só foi encontrada nos tumores não funcionantes de origem gonadotrófica. Os outros tumores expressam o MEG3. Os dados sugerem que a hipermetilação da região intergénica diferentemente metilada é a causa da sobre-expressão nos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes.⁴¹¹ Em resumo, alterações nas vias de sinalização Ras-BRAF-MAPK e Wnt, e na expressão da MEG3, podem desempenhar um papel na génese dos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes.

3.3. Clínica

Os tumores da hipófise podem-se apresentar incidentalmente ou com uma variedade de manifestações neuro-oftalmológicas e endocrinológicas (hipersecreção de hormonas hipofisárias, hipossecreção ou ambas). O desejável é um diagnóstico clínico precoce de forma a condicionar uma menor morbidade e um tratamento mais atempado e eficaz. No adulto a causa mais comum de disfunção hipotálamo-hipofisária são os tumores da hipófise, dos quais a maioria é secretora. Assim, os sintomas mais precoces destes tumores devem-se a alterações endocrinológicas que antecedem as manifestações locais, como as cefaleias e as alterações visuais, uma vez que são manifestações mais tardias, observadas em doentes com tumores de maiores dimensões ou com extensão supra-selar. Em crianças, os tumores da hipófise são incomuns, sendo os craniofaringeomas e outros tumores hipotalâmicos os mais frequentemente responsáveis pela disfunção neuroendócrina.

Clinicamente, devido à falta de expressividade hormonal, os tumores da hipófise clinicamente não funcionantes podem variar de completamente assintomáticos, e por conseguinte serem apenas diagnosticados em estudos de autópsia ou incidentalmente em

estudos de ressonância magnética ou de tomografia axial computadorizada (atingindo os 9% em séries cirúrgicas mais recentes),^{426,427,428} até serem motivo de causar uma lenta, progressiva e significativa disfunção hipotálamo-hipofisária, e de sintomas neurológicos, devido às suas maiores dimensões e efeito de massa sobre as estruturas envolventes (em cerca de 50% a 80% dos doentes).⁴²⁹ Menos frequente é a sua apresentação de forma aguda, como uma emergência médica, devido a apoplexia hipofisária com hemorragia intra-tumoral em aproximadamente 15% a 25%.⁴²⁹ Embora não exista evidência de hiperprodução hormonal pode haver, contudo, hiperprolactinemia moderada devido a compressão da haste hipofisária. A diabetes insípida é rara nos tumores da hipófise; se presente dever-se-á pensar em outro tipo de patologia. A idade média de apresentação clínica situa-se entre os 50 e 55 anos, com uma ligeira preponderância no sexo masculino (56,7%).^{45,404}

Efeitos de massa

As cefaleias ocorrem em cerca de 40% a 60% dos doentes.^{430,431,432} Classicamente é considerado que uma massa em expansão, em uma estrutura óssea relativamente rígida acompanhada do estiramento das meninges bem como de um aumento da pressão selar, pode determinar o seu aparecimento.⁴³³ No entanto, o mecanismo exacto das cefaleias associadas aos tumores da hipófise, permanece ainda desconhecido. Contudo parece que uma associação entre factores físicos (estiramento da dura e invasão do seio cavernoso) e bioquímicos (particularmente nos tumores funcionantes e secretores de prolactina ou de somatotrofina), bem como uma predisposição genética estarão envolvidos neste sintoma.⁴³⁴ A hemorragia e enfarte hemorrágico do tumor (apoplexia) podem ser a manifestação de apresentação em alguns doentes e estão associados a um aumento súbito da pressão intra-selar e à irritação de estruturas dentro do seu cavernoso, levando ao aparecimento de cefaleias súbitas e severas, défices visuais e hipopituitarismo.⁴³⁴

O grau e direcção da extensão do tumor determinam a presença de sintomas adicionais. A extensão supra-selar com compressão do quiasma óptico pode condicionar compromisso dos campos visuais, sendo a situação mais típica e frequente a hemianópsia bitemporal, embora qualquer défice campimétrico possa estar presente. O defeito bitemporal é explicado pela anatomia das vias ópticas no quiasma óptico. O cruzamento das fibras inferiores nasais localiza-se na região anterior do quiasma e, por conseguinte, são habitualmente as primeiras a serem afectadas. Isto condiciona o padrão de defeito visual típico: a amputação dos campos visuais temporais superiores. No entanto, também ocorrem, em ambos os olhos, defeitos assimétricos, dependendo do padrão de crescimento do tumor.⁴³⁵ Uma compressão prolongada pode levar a atrofia do nervo óptico e perda de acuidade visual. Os sintomas visuais estão presentes em cerca de metade dos doentes. Uma avaliação oftalmológica é indispensável logo que seja efectuado o diagnóstico e uma cirurgia descompressiva atempada pode reverter parcial ou totalmente o compromisso óptico.⁴⁰⁴ Os tumores com extensão para-selar podem causar compressão ou invasão dos seios cavernosos, o que nem sempre tem tradução clínica. Foi descrita uma incidência de 14% de sintomas relacionados com a pressão nos nervos

cranianos, embora houvesse evidência de envolvimento dos seios cavernosos em 48% dos doentes.⁴³⁶ O terceiro par craniano é o mais frequentemente envolvido, seguido do VI e do IV pares, levando a ptose, oftalmoplegia e diplopia, que podem ser reversíveis com a decompressão cirúrgica.⁴³⁷ A pressão dos lobos temporais é rara e pode ser causa de convulsões.⁴³⁸

Hipopituitarismo

Os sintomas relacionados com hipopituitarismo, parcial ou global, tais como, astenia, diminuição da libido, disfunção erétil e irregularidades menstruais são prevalentes e estão presentes em cerca de 50% a 70% dos doentes.^{404,429} O estudo funcional hipofisário é uma indicação formal e essencial, uma vez que revela uma incidência ainda superior de insuficiências hipofisárias. O compromisso dos eixos é variável consoante as séries mas, em média, o eixo gonadal é o mais frequentemente afectado em 75% a 77% dos casos, seguido do cortico supra-renal em 28% a 38% e do tiroideu em 22% a 32%.^{404,435} Na maioria das séries a secreção de somatotrofina não foi formalmente avaliada, mas um estudo recente encontrou deficiência em 77% dos doentes,⁴³⁹ embora outros autores considerem que possa estar presente em aproximadamente 85% dos casos.⁴³⁵ O hipopituitarismo nos doentes com macroadenomas pode ser justificado por três mecanismos: 1) compressão da haste hipofisária e diminuição do aporte das neurohormonas hipotalâmicas; 2) compressão do tecido hipofisário funcionante; 3) envolvimento do hipotálamo pelo tumor. Um dos mecanismos mais importante envolvidos no hipopituitarismo é a compressão mecânica dos vasos porta e da haste hipofisária o que leva a uma diminuição do aporte das neurohormonas hipotalâmicas às células da hipófise. Por este mesmo mecanismo a diminuição do aporte de dopamina pode levar a uma hiperprolactinemia em cerca de 35% dos doentes. Habitualmente os níveis de prolactina não excedem os 100 µg/L (isto é, cerca de cinco vezes o limite superior do normal).^{440,441} Se não houver destruição isquémica do tecido hipofisário normal a decompressão cirúrgica pode reverter o hipopituitarismo.^{442,443,444}

Hipersecreção gonadal

Em uma minoria de doentes, gonadotrofinas biologicamente activas, especialmente FSH, podem ser detectadas mas os sintomas associados à sua hipersecreção são raros.^{445,446} Estes podem resultar em uma síndrome de hiperestimulação ovárica com irregularidades menstruais, dor abdominal e evidência de aumento de volume dos ovários; elevações do estradiol; aumento do volume testicular e puberdade precoce. Estas situações são raras e ocorrem com macroadenomas.⁴⁰⁴

3.4. Diagnóstico

O diagnóstico dos tumores da hipófise tem como pilares fundamentais uma avaliação clínica cuidada e precisa, estudo hormonal da função hipofisária, exame neurooftalmológico e avaliação imagiológica em que a ressonância magnética constitui o exame de eleição.

Os tumores da hipófise são as lesões mais frequentemente encontradas nas cirurgias da região selar, representando cerca de 85% das lesões ressecadas.⁴¹⁰ No entanto, é importante considerar o diagnóstico diferencial com outras formações neoplásicas, nomeadamente com craniofaringeomas, meningiomas do tubérculo selar, gliomas do hipotálamo e dos nervos ópticos, germinomas, hamartomas, cordomas, e metástases; outras lesões não neoplásicas, como os quistos da bolsa de Rathke, epidermóides e aracnoideus, bem como com outras lesões como os aneurismas da artéria carótida interna, hipofisites, doenças granulomatosas, mucocelos do seio esfenoidal, áreas focais de enfarte, etc.^{404,447,448,449,450,451} O diagnóstico correcto é crucial uma vez que as implicações terapêuticas são diferentes consoante o tipo de lesão.⁴⁰⁴ Alguns indivíduos sem patologia da hipófise têm, estatisticamente, hipófises que excedem os limites do normal de 9 mm (+3 desvio padrão em relação aos indivíduos saudáveis).^{452,453,454,455} Esta 'hipertrofia hipofisária normal' tem um sinal homogéneo e isoíntenso e capta homogeneamente o produto de contraste na ressonância magnética.⁴⁵⁵ O estudo histológico dos casos que foram submetidos a cirurgia revelou tecido hipofisário normal.⁴⁵⁵ Finalmente há ainda artefactos ou variantes anatómicas que podem mimetizar adenomas ou outras lesões hipofisárias.⁴⁵⁰

O estudo da função hipofisária é importante não só para diagnosticar os hipopituitarismos como também para identificar a eventual hiperprodução gonadal. Embora a FSH e LH intactas só raramente estejam elevadas, as provas dinâmicas, como a prova da TRH, podem induzir uma elevação da β -FSH, β -LH e da α -subunidade em 30% a 60% dos casos.^{456,457} Contudo, esta permanece uma prova de investigação uma vez que o doseamento das subunidades não está disponível na rotina, a elevação das subunidades das gonadotrofinas não é específica, também podendo acontecer em outros tipos de tumores da hipófise⁴⁵⁸ e, finalmente, a TRH pode, em casos excepcionais, induzir uma apoplexia do tumor.⁴⁵⁹ Assim sendo, a avaliação de base das gonadotrofinas permanece o método de rastreio mais usado, com as suas limitações, nomeadamente no período após a menopausa. Por outro lado é defendido que o seu doseamento não será de grande relevância devido à expressividade clínica ser muitas vezes ausente e não ter implicações na orientação do tratamento.⁴⁶³

O doseamento da prolactina é uma indicação formal, sendo a presença de hiperprolactinemia e o seu diagnóstico diferencial um aspecto importante e indispensável. É determinante saber se a hiperprolactinemia é secundária a uma compressão da haste hipofisária por um macroadenoma clinicamente não funcionante ou devida a um prolactinoma. Nestes casos, o tratamento primário é médico, com os agonistas da

dopamina e não cirúrgico. Esta questão foi investigada em uma série de 226 tumores não funcionantes tendo-se verificado que 38,5% tinham hiperprolactinemia; em 98,7% destes casos a prolactinemia não excedia os 100 µg/L, sugerindo que apenas valores superiores a este limite seriam sugestivos de macroprolactinomas.⁴⁴⁰ De uma forma geral é considerado que valores superiores a 200-250 µg/L (valores superiores a 500 µg/L são inequivocamente diagnósticos de macroprolactinoma)⁴⁶⁰ estão em relação com tumores secretores de prolactina; e valores inferiores com disfunção da haste.⁴⁶³ Para tumores de dimensões extremamente grandes as amostras de prolactina devem ser diluídas pelo menos 1:1.000 para excluir a existência de um eventual efeito de gancho (*hook*) condicionando resultados falsamente baixos, isto é, falsos negativos.^{461,462} Uma vez que a lesão selar mais comum é um tumor da hipófise, parece razoável proceder a uma investigação de hiperprodução hormonal dos restantes sectores, independentemente das dimensões da lesão. Muitas das alterações são subtis e lentamente progressivas pelo que o seu rastreio, mesmo em indivíduos assintomáticos, tem indicação. Não está claro que os corticotrofinomas e os somatotrofinomas silenciosos, com evidência clínica mínima de hiperfunção hipofisária, não tenham um risco acrescido de efeitos secundários (embora subtis), nomeadamente cardiovasculares, ósseos, oncológicos e outros, tipicamente associados a este tipo de tumores quando clinicamente funcionantes.⁴⁶³ O rastreio de hiperprodução hormonal foi questionado com base na relação custo-eficácia.^{464,465} No entanto, há autores que o defendem, pois ao diagnosticar tumores secretores pré-operatoriamente torna-se possível a opção por diferentes tipos de orientação terapêutica. A IGF-1 é provavelmente suficiente para o rastreio dos somatotrofinomas; se houver dúvidas, poder-se-á proceder à demonstração da não supressão da somatotrofina com uma prova de hiperglicemia por sobrecarga oral de glicose.⁴⁶⁶ As provas de rastreio da síndrome de Cushing mais eficazes são a prova de frenação nocturna do cortisol com baixa dose de dexametasona, o doseamento do cortisol livre em urina de 24 horas e o cortisol salivar às 24h.^{467,468} Se houver alterações então proceder-se-á a estudos mais definitivos. Relativamente ao hipopituitarismo os microadenomas raramente levam a insuficiências hipofisárias. Os macroadenomas podem condicionar vários graus de insuficiência hipofisária por compressão do hipotálamo, da haste hipotálamo-hipofisária e da própria hipófise. Por conseguinte todos os macroadenomas devem ser investigados para o hipopituitarismo.

O diagnóstico imagiológico impõe-se nos doentes com sintomas ou sinais sugestivos de uma lesão hipofisária. A ressonância magnética com gadolínio é o exame de eleição pela sua superioridade na definição selar e das estruturas envolvidas.⁴⁶⁹ Esta permite uma delimitação precisa do conteúdo selar, do quiasma e dos nervos ópticos e o estabelecimento claro do grau de invasão das estruturas adjacentes ao tumor. Para além destas vantagens a ressonância magnética tem características singulares que permitem a melhor identificação da lesão em causa:⁴⁷⁰ os adenomas nas imagens em T1 habitualmente são hipointensas ou isointensas relativamente ao tecido hipofisário normal; após a administração do produto de contraste em geral, os adenomas mantêm-se hipointensos, devido a uma precoce e mais intensa captação pelo tecido hipofisário

normal.⁴⁶⁹ A tomografia axial computadorizada só tem vantagem para a detecção de microcalcificações, unicamente em alguns macroprolactinomas sendo mais frequentes nos craniofaringeomas. Até ao momento actual a cintigrafia com octreotido marcado ou a tomografia de emissão de positrões não mostraram vantagens no estudo de imagem destes tumores.

3.5. Tratamento

O tratamento dos tumores da hipófise é individualizado dependendo não só do tipo de tumor como das particularidades do doente em causa. Classicamente podemos dividir as diferentes abordagens do tratamento em: conservador ou de observação cuidada, cirúrgico, farmacológico e radioterapêutico podendo ser complementares.

Os objectivos do tratamento são: remoção ou redução do volume tumoral; correcção da hipersecreção ou hipossecreção hormonais; preservação da secreção normal de outros eixos hormonais; preservação da integridade anatómica de estruturas nobres vizinhas. Habitualmente estes objectivos são mais facilmente atingidos nos microadenomas, sendo mais difíceis de atingir nos macroadenomas, que frequentemente requerem tratamentos múltiplos nem sempre bem sucedidos.

As opções de tratamento para os tumores da hipófise clinicamente não funcionantes incluem todas as atrás mencionadas, embora actualmente, em primeira linha esteja a abordagem cirúrgica e a menos eficaz, seja o tratamento farmacológico.

Observação

Nos tumores clinicamente não funcionantes, esta opção terapêutica está habitualmente reservada para os microadenomas ou tumores intra-selares sem compromisso das estruturas envolventes ou insuficiências hipofisárias, cuja estratégia óptima constitui um desafio. A decisão deve ser individualizada devendo ter em consideração a idade do doente, a proximidade do tumor com o quiasma óptico, a função hipofisária, o estado de fertilidade, e a preferência do doente.⁴³⁵ As principais desvantagens de uma abordagem conservadora são a possibilidade de crescimento com défices visuais, e de apoplexia e hipopituitarismo.⁴⁷⁴

Os doentes assintomáticos, com tumores sem extensão extra-selar significativa e sem repercussões endócrinas, podem, de facto, ter uma abordagem terapêutica conservadora. A história natural dos tumores não tratados pode ser inferida do seguimento dos tumores incidentalmente diagnosticados^{471,472,473,474,475} e dos doentes sintomáticos em que, por algum motivo, a cirurgia foi diferida.⁴⁷⁶ Apesar de os estudos serem heterogéneos em muitos aspectos, e a confirmação histológica estar ausente, a evolução previsível dos microadenomas é de uma baixa tendência de crescimento tumoral (3,2% a 12,5%)^{475,477} enquanto que os macroadenomas têm uma tendência de crescimento tumoral em 30% a

50% dos casos.^{474,475,476} Assim sendo, o seguimento médico observacional é um procedimento seguro para os microadenomas, mas é questionável para os macroadenomas. Nestes há vários motivos de preocupação: primeiro, espera-se uma elevada incidência de aumento do volume do tumor com o decorrer de anos de seguimento; segundo, em aproximadamente metade dos doentes em que, o tumor aumenta há sintomas de insuficiências hormonais ou defeitos campimétricos, ou mesmo desenvolvimento de hemorragia e apoplexia em cerca de 10% dos casos;⁴³⁵ finalmente, o atraso na cirurgia pode reduzir a probabilidade da remoção macroscópica total do tumor, com conseqüente aumento da possibilidade de recorrência da doença. Protelar a cirurgia pode levar a que o tumor adquira uma dimensão e um grau de invasão tais, que tornam a ressecção total impraticável. Embora não existam marcadores seguros preditivos do crescimento do tumor, o risco de aumento do seu volume é significativamente maior em tumores com dimensões superiores a 15 mm.⁴⁷⁵

Tratamento cirúrgico

Os objectivos da cirurgia devem ser devidamente estabelecidos e individualizados para cada doente. O risco de uma cirurgia hipofisária, por um cirurgião experiente é pequeno mas não ausente. Quando o tratamento cirúrgico é a opção terapêutica, os objectivos prioritários são: 1) remoção o maior possível da massa tumoral para libertação das vias ópticas e redução o mais possível de tecido hormonalmente activo (se presente); 2) evitar lesões neurológicas adicionais; 3) tentar proteger o tecido hipofisário normal.⁴⁷⁸

Diversos factores concorrem para o êxito destes objectivos: 1) a experiência do cirurgião: foi demonstrado que um cirurgião experimentado na hipófise (o que realiza mais de 50 cirurgias por ano), tem duas a três vezes mais sucesso nos tumores hormonalmente activos e duas a quatro vezes menos complicações cirúrgicas, do que um menos experiente;^{479,480} 2) as dimensões do tumor: os microadenomas são susceptíveis de poderem ser macroscopicamente removidos em cerca de 80 a 90% dos casos. O sucesso da cirurgia nos macroadenomas é menos favorável. Na generalidade só cerca de 50% a 60% serão completamente removidos por um cirurgião experiente.⁴⁸¹ Quanto maior a dimensão menor a probabilidade de sucesso da cirurgia. Tumores com diâmetros superiores a 20 mm só serão completamente removidos em cerca de 20% dos casos;⁴⁸² 3) a localização do tumor: esta também é determinante, tumores intra-selares ou com discreta erosão do pavimento, são de mais fácil acesso do que os invasivos dos seios cavernosos (que podem impossibilitar a remoção aparentemente total) e os com extensão superior e adesão às vias ópticas ou ao hipotálamo (em que pode haver danos da visão ou lesão dos núcleos do hipotálamo); 4) a consistência do tumor: a maioria dos tumores tem uma consistência mole e é facilmente curetável. Em contraste, alguns são muito fibrosos e apenas ressecções limitadas são possíveis, sendo esta variável imprevisível uma vez que só durante o acto cirúrgico tal é possível averiguar; 5) outras variáveis como a densidade de vascularização que pode resultar em hemorragia intra-operatória obrigando o cirurgião a interromper a cirurgia.²⁹⁹

As vias de abordagem cirúrgica podem ser divididas em transesfenoidais (transnasal transesfenoidal directa por microscópio, transnasal transesfenoidal directa por endoscópio, transesfenoidal alargada) e transcranianas (subfrontal unilateral, pterional). Cerca de 90% dos tumores são removidos por via transesfenoidal. Uma vez que os macroadenomas são invasivos das estruturas vizinhas, só raramente, é possível uma remoção a 100%. O objectivo de uma remoção máxima e segura é de 95% do tumor.²⁹⁹

As indicações e agressividade da cirurgia nos tumores da hipófise devem ter em atenção diversos factores, nomeadamente, o facto de serem tumores na sua quase totalidade benignos, habitualmente de crescimento indolente e a sua natureza funcional. Assim sendo, durante a cirurgia, o objectivo pode não ser o da excisão radical do tumor a todo o custo, mas a resolução de qualquer efeito de massa, a preservação ou a restauração da função visual, e a obtenção de um adequado controlo funcional e de volume do tumor a longo prazo.⁴⁸³

A cirurgia transesfenoidal é o tratamento de eleição dos tumores clinicamente não funcionantes. A cirurgia transcraniana, hoje em dia é cada vez menos usada e está reservada para os casos pouco frequentes em que não há pneumatização do seio esfenoidal ou para tumores maioritariamente extra-selares.⁴²⁶ A evolução do microscópio e da neuronavegação via endoscópica tem permitido cirurgias cada vez menos agressivas sendo a via transesfenoidal a de eleição. Actualmente, a cirurgia transesfenoidal assistida por endoscopia é a mais usada mesmo em tumores de grandes dimensões, com extensões supra e para-selares, com o mesmo sucesso terapêutico e sem os efeitos adversos de uma cirurgia mais invasiva, como a transcraniana.

A cirurgia transesfenoidal tem sido igualmente comparada à microcirurgia. A introdução do endoscópio permitiu ao neurocirurgião verificar se a remoção foi completa com uma baixa taxa de complicações e um desconforto pós-operatório mínimo. Uma das limitações, para além das atrás mencionadas, é a experiência do neurocirurgião com esta técnica.⁴⁸³ Estes tumores são habitualmente de apreciáveis dimensões e a ressecção total é um desafio. Após análise de várias séries, a presença de invasão dos seios cavernosos e o diâmetro máximo mostraram-se factores preditivos negativos de uma ressecção completa.^{427,428,436} A percentagem de remoção macroscópica total é altamente variável, variando de 27%^{439,484,485} até cerca de 83%,^{486,487,488} possivelmente reflectindo o aperfeiçoamento e melhoria das técnicas de imagem e cirúrgicas ao longo do tempo, bem como a experiência cumulativa dos cirurgiões especializados. Este aspecto não deve ser negligenciável uma vez que a ausência de resíduo tumoral pós-operatório visível é um factor determinante de remissão a longo prazo.^{426,436,439} Mesmo se o tumor não for passível de ressecção total, a redução da massa tumoral está associada à resolução das cefaleias na maioria dos casos, melhoria rápida dos defeitos dos campos visuais em cerca de 80% dos doentes, com normalização completa em 40%.^{427,439} A recuperação da visão pode ser documentada dias após a cirurgia.^{489,490} Em alguns doentes a melhoria da visão pode continuar até cerca de um ano após a intervenção cirúrgica.^{490,491,492} Nos macroadenomas com compromisso da visão o tratamento cirúrgico não deve ser

protelado, uma vez que existe uma correlação significativa entre a gravidade e a duração da perda de visão antes da cirurgia e a persistência de défices visuais após o tratamento. A maioria dos estudos refere uma melhoria da função hipofisária após a cirurgia.^{426,427,442,443,444} Dois grandes estudos recentes, de *Losa et al.*⁴²⁶ e de *Nomikos et al.*,⁴²⁷ evidenciaram uma melhoria da função hipofisária gonadal, cortico supra-renal e tiroideia em 32,8%, 41,6% e 35,7% e em 64,9%, 71,9% e 33,9% dos doentes, respectivamente, e um agravamento pós-cirúrgico da função gonadal, cortico supra-renal e tiroideia em 5,8%, 7,5% e 5,6% e em 2,1%, 4,5% e 1,5% dos doentes, respectivamente. A diferente forma de avaliação e critérios de diagnóstico do hipopituitarismo, contribuem para a variação da incidência de hipopituitarismo pré e pós cirurgia, referidas pelos diferentes autores. De uma forma global, poder-se-á dizer que após a cirurgia o hipopituitarismo se mantém em uma percentagem importante de casos: deficiência de GH em cerca de 83%; deficiência de FSH/LH em cerca de 60%; e deficiência de ACTH e TSH em 30%.⁴³⁵ Em contraste com os benefícios no compromisso da função visual, a cirurgia habitualmente não restabelece a função hipofisária, embora os dados pós-operatórios da literatura sejam conflituosos. É importante referir que a utilização de diferentes métodos e critérios de avaliação da função hipofisária contribuem para as diferenças observadas entre as várias séries.⁴³⁵ A probabilidade de recuperação da função hipofisária é menor nos tumores clinicamente não funcionantes do que nos funcionantes.⁴⁹³ Uma vez que a recuperação da função hipofisária nos tumores clinicamente não funcionantes é pequena, o objectivo principal da cirurgia deverá ser a melhoria e protecção da função visual, e não tanto a recuperação funcional.

As complicações cirúrgicas e a mortalidade estão directamente correlacionadas com a experiência do neurocirurgião e o volume de cirurgias realizado em cada centro.^{494,495} Complicações *major* são pouco frequentes e incluem agravamento da perda de visão (0,5% a 2,4%), rinorráquis (1,5% a 4,2%), lesão da artéria carótida interna (0,4% a 1,4%), meningite (0,5% a 1,9%), oftalmoplegia (0,4% a 1,9%) e hemorragia no leito tumoral (0,8% a 2,8%). A diabetes insípida transitória ocorre em até 15% das cirurgias, mas a permanente é menos frequente, ocorrendo em 0,9% a 5% dos doentes.^{496,497} A mortalidade peri-operatória é baixa, 0,2% a 1,2%.⁴⁰⁴ Os tumores gigantes, definidos como tendo dimensões superiores a 4 cm, têm habitualmente uma evolução menos favorável.^{498,499}

Concluindo, a cirurgia continua a ser o tratamento de eleição para este tipo de tumores. A principal razão de operar deve-se aos efeitos de massa neurológicos ou endocrinológicos. Pensa-se que as cefaleias se devem ao estiramento do diafragma selar pela massa; assim sendo, um tumor de pequenas dimensões é pouco provável que condicione cefaleias. A invasão dos seios cavernosos raramente condiciona oftalmoplegia. Por conseguinte, a principal razão para operar um adenoma clinicamente não funcionante é o compromisso da visão. Esta situação habitualmente ocorre quando o tumor ultrapassa em 10 mm a 15 mm o diafragma selar. Embora a remoção macroscópica total do tumor seja o objectivo, uma redução significativa do seu volume é, habitualmente, suficiente para descompressão do quiasma óptico, atingindo assim o objectivo *major* da cirurgia. Os incidentalomas

colocam algumas questões. A decisão de operar depende das dimensões do tumor, da função hipofisária, da idade e condições do doente.

A apoplexia hipofisária consiste em um enfarte agudo (frequentemente associado a hemorragia) de um adenoma da hipófise.⁵⁰⁰ Por regra são macroadenomas de apreciáveis dimensões, e a expansão súbita do volume tumoral é frequentemente acompanhada por cefaleias intensas, vômitos, alterações do estado de consciência, defeitos dos campos de visão podendo mesmo haver cegueira, e oftalmoplegia. A maioria desenvolve igualmente um hipopituitarismo. O tratamento requer administração urgente de corticoesteróides em doses de stresse, fluidos, e controlo da dor. O papel da cirurgia de urgência é controverso: alguns estudos confirmam a melhor evolução mas outros não. No entanto, atendendo às potenciais consequências da apoplexia (compromisso visual permanente) e ao baixo risco da descompressão transesfenoidal, é prudente a remoção da parte acessível do tumor para redução da pressão intrasselar em doentes com défices óbvios (em especial rapidamente progressivos) dos nervos cranianos.²⁹⁹ Nos doentes que se apresentam com perda súbita total ou quase total da visão, a intervenção cirúrgica está indicada, resolvendo o défice de visão e as parésias oculares na maioria dos casos.^{501,502,503} Uma abordagem conservadora, com seguimento apertado será apropriada em doentes seleccionados (com ausência ou ligeiros sinais oftalmológicos), sem que isso signifique necessariamente uma evolução adversa.^{474,501,504} Nestes doentes os sintomas podem-se resolver espontaneamente entre semanas a meses.⁴⁷⁴

Após a cirurgia dever-se-ão avaliar a visão e a função hipofisária e, se pré-existente, o hipopituitarismo. A extensão de remoção do tumor deve ser documentada por ressonância magnética a realizar pelo menos 3 meses após a cirurgia, uma vez que imagens muito precoces são pouco precisas dadas as alterações pós-cirúrgicas.⁵⁰⁵ Quando a remoção é sub-total não há consenso sobre qual o melhor procedimento.

A radioterapia é eficaz na prevenção do crescimento tumoral, mas tem complicações significativas a longo prazo. Por outro lado, adiar qualquer tipo de tratamento está associado a uma taxa de progressão de cerca de 40%.⁴⁰⁴ Por conseguinte poder-se-á estratificar o risco e seleccionar os doentes: de elevado risco, para uma intervenção activa e os de baixo risco, para uma vigilância cuidada.

O comportamento dos resíduos tumorais não tratados é difícil de prever, uma vez que não há marcadores seguros do seu comportamento biológico. Habitualmente tem-se optado por uma atitude conservadora, de observação, em doentes sem resíduo visível ou com pequeno resíduo pós-operatório. Os tumores de maiores dimensões, com extensão extra-selar ou mais agressivos, são habitualmente re-operados ou enviados para a radioterapia. Grenman Y e Stern N⁴⁰⁴ fizeram uma revisão de séries em que a abordagem pós cirúrgica foi apenas de observação em que usaram a tomografia computadorizada ou ressonância magnética para a avaliação do estado tumoral após a cirurgia. Na globalidade, a taxa de recorrência foi de 17% para os doentes que inicialmente tinham uma remoção macroscópica total, e de 43% para os doentes com massa residual após a cirurgia. A idade mais jovem,⁴²⁷ a invasão dos seios cavernosos,⁴²⁸ a extensão supra-selar,⁴³⁶ e a duração do

seguimento⁴³⁹ estavam associadas a um aumento do risco de recorrência ou de progressão. Por outro lado as características histopatológicas não tiveram uma correlação particular com o comportamento do tumor.⁵⁰⁶ Por imunohistoquímica o anticorpo anti Ki-67 (epítipo MIB-1) mantém-se o marcador de proliferação mais estudado. Embora alguns estudos tenham encontrado um índice de marcação de Ki-67 superior nos tumores invasivos,^{507,508} outros não confirmaram tal achado.⁵⁰⁹ Contudo, os raros tumores com índice de marcação do Ki-67 superior a 3% (conjuntamente com imunoreactividade para o p53) foram classificados, pela Organização Mundial de Saúde, como adenomas atípicos e têm, caracteristicamente, um comportamento mais agressivo.⁵⁰⁶

Radioterapia

A radioterapia é um tratamento adjuvante para alguns tumores da hipófise, e só em condições muito especiais poderá ser o tratamento de primeira linha. Nos tumores funcionantes induz a uma diminuição ou normalização progressiva da secreção hormonal, e nos doentes com tumores não funcionantes irressecáveis e de crescimento recorrente e progressivo, leva a uma estabilização do crescimento tumoral e a um controlo apreciável a longo prazo. A insuficiência hipotálamo-hipofisária é a complicação tardia mais frequente, embora possam surgir outras complicações menos frequentes. As técnicas modernas e de elevada precisão de radioterapia conformacional e esterotáxica poderão levar a menores lesões do tecido normal do que a radioterapia convencional e por consequência a menor morbilidade tardia. No entanto, para provar este eventual benefício, mais estudos a longo prazo serão necessários.⁵¹⁰

A radioterapia externa convencional é realizada com fotões emitidos a partir de um acelerador linear. Na preparação do tratamento são necessários: a imobilização do doente com dispositivos próprios, a imagiologia, com tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM), para localização precisa do tumor e o planeamento computadorizado a três dimensões (3-D) da forma do tumor. O objectivo é atingir uma dose homogénea para o volume alvo planeado, com a menor dose possível nos tecidos normais circundantes. Habitualmente são usados três campos de radiação, um anterior oblíquo e dois laterais atravessando as regiões temporais. A emissão da radiação é formatada por um colimador de multi-folhas para adaptação do feixe à forma do tumor e assim poupar as estruturas envolventes; esta é a designada radioterapia conformacional. O colimador também pode ser utilizado para intensificar a dose de radiação para as regiões alvo; esta é designada de radioterapia de intensidade modelada. Parece não haver vantagem entre a radioterapia de intensidade modelada e a conformacional no tratamento dos tumores da hipófise.⁵¹⁰

A técnica esterotáxica (radiocirurgia e radioterapia conformacional esterotáxica) permite uma definição mais precisa do tumor e das estruturas críticas adjacentes, e a administração mais precisa do tratamento. Trata-se de um refinamento da radioterapia conformacional.⁵¹⁰

A irradiação esterotóxica pode ser administrada em apenas uma fracção usando quer a radiação γ por cobalto 60 ou um acelerador linear, orientada por tomografia computadorizada esterotóxica, de forma a haver um feixe de alta dose de radiação que vai actuar como que um 'bisturi', a radiocirurgia, ou em doses fraccionadas de um acelerador linear, a radioterapia fraccionada esterotóxica. A radiocirurgia tem limitações: está mais indicada nos tumores de pequenas dimensões, que distem pelo menos 5 mm das estruturas nervosas ópticas e doses que não condicionem ablação de tecido não tumoral.⁵¹⁰

A dose de radiação varia de acordo com o tipo de radioterapia usado. Grande parte dos tumores que requerem radioterapia localizam-se próximo do quiasma óptico ou dos seios cavernosos. O entusiasmo inicial pela radiocirurgia decaiu, devido à proximidade destas estruturas e à incidência inaceitável de neuropatia óptica rádica induzida.⁵¹¹ Uma vez que esta complicação é dependente da dose, o objectivo actual é não ultrapassar uma dose única de 8 a 10 Gy. A radioterapia estereotóxica fraccionada ou convencional é administrada em uma dose de 45 a 50 Gy em fracções diárias inferiores a 2 cGy, o que é inferior à dose de tolerância do sistema nervoso central e se acompanha de um risco mínimo de lesão estrutural rádica (<1%). Actualmente não há evidência clara da superioridade da radiocirurgia sobre a radioterapia convencional fraccionada.⁵¹⁰

A avaliação da eficácia da radioterapia nos tumores da hipófise deve considerar a sobrevivência, o controlo do volume do tumor, a produção hormonal (nos funcionantes) e a qualidade de vida. No que se refere ao controlo do volume do tumor vários estudos apontam para que, 10 anos após a radioterapia externa ter havido um controlo do volume do tumor em 80% a 94% dos casos.^{512,513,514,515,516,517,518} Na série maior de 411 doentes, aos 10 anos o controlo foi de 94% e aos 20 anos de 89%.⁵¹² Relativamente ao controlo hormonal há diferenças e na acromegalia é referida uma taxa de redução da somatotrofina após a radioterapia convencional de cerca de 50% após 27 (\pm 5) meses; já a redução da IGF-1 se mostrou mais lenta, com uma normalização em 60% dos doentes ao fim de 5 a 10 anos;⁵¹⁹ na doença de Cushing a taxa de normalização descrita do cortisol livre urinário é de 50% a 100%, maioritariamente ao fim de 2 anos;⁵²⁰ nos prolactinomas este tipo de tratamento só muito excepcionalmente é usado (não tanto para normalização da prolactina, que se pode manter elevada), sobretudo para controlo do crescimento tumoral.⁵¹⁰

A toxicidade da radioterapia externa fraccionada não é negligenciável sendo o hipopituitarismo o efeito secundário mais frequente. A curto prazo os efeitos secundários mais frequentes que têm sido descritos são, náuseas, astenia, mal-estar geral e otite média serosa. Mais tardiamente podem surgir: 1) o hipopituitarismo, a morbilidade a prazo mais frequente cuja incidência vai aumentando com o decorrer do tempo, e que resulta primariamente da irradiação hipotalâmica, podendo no entanto também estar presente por lesão hipofisária directa. Em apenas estudos de doentes com função hipofisária prévia normal, a terapêutica de substituição tornou-se necessária em 20% a 40% ao fim de 10 anos de seguimento.⁵¹⁰ Segundo outros autores, o hipopituitarismo

estará presente mais precocemente em 50% a 60% dos doentes, entre os 5 e os 10 anos; 2) a neuropatia óptica induzida pela radiação, representa um risco de 1,5%; 3) a epilepsia; 4) a radionecrose cerebral, isto é, a necrose das estruturas normais cerebrais em 0,2%; 5) alterações das funções cognitivas em adultos têm sido referidas, mas suscitando controvérsia uma vez que poderá haver um viés de avaliação devido às alterações induzidas pela cirurgia e pelo próprio tumor;^{521,522} 6) o aumento do risco de desenvolvimento de tumores cerebrais induzíveis por radiação, sendo a incidência de gliomas e meningiomas de aproximadamente 2% ao fim de 10 a 20 anos;^{523,524,525,526} 7) o risco de acidentes vasculares cerebrais. Parece haver um aumento da incidência dos acidentes vasculares e excesso de mortalidade cerebrovascular nesses doentes não estando a influência da radiação perfeitamente estabelecida. Possivelmente outros factores de risco vasculares estarão implicados e poderão concorrer para esta morbi-mortalidade.^{527,528,529,530}

A toxicidade induzida pela radioterapia conformacional estereotáxica tem sido descrita como semelhante à da radioterapia convencional. A vantagem técnica de maior precisão, com o objectivo de minimizar a irradiação de tecido cerebral normal, poderá vir a ter melhores resultados de morbi-mortalidade a longo prazo, apesar de, até ao momento, ainda não haver evidência clínica. A radiocirurgia, para além da comodidade do doente, também não parece ter uma vantagem significativa, tendo indicações muito precisas e limitantes.⁵¹⁰

Um número pequeno de doentes com adenomas da hipófise, progride apesar de ter sido submetido a radioterapia. A re-irradiação é considerada de elevado risco devido ao efeito deletério cumulativo da radiação no tecido cerebral normal, particularmente no quiasma e nervos ópticos. As técnicas esterotáxicas ainda não têm um recuo suficiente de segurança mas, em teoria, o seu risco não será superior ao das técnicas clássicas. A radiocirurgia só poderá ser usada em tumores afastados do quiasma óptico e dos nervos ópticos. Tem sido usada pontualmente em tumores secretores recorrentes com uma eficácia semelhante à terapêutica primária.^{531,532}

Em conclusão, a radioterapia é um tratamento eficaz em doentes com tumores da hipófise progressivos não controlados pela cirurgia ou terapêutica médica, permitindo um bom controlo do crescimento tumoral e de produção hormonal. O hipopituitarismo é a complicação mais frequente, tendo os outros efeitos secundários uma incidência baixa, mas não negligenciável. Continua a haver muita controvérsia e debate sobre a relativa eficácia da radiocirurgia e radioterapia conformacional estereotáxica. A eficácia desta última no controlo do tumor é comparável aos resultados da radioterapia convencional externa. A radiocirurgia parece conduzir a um menor controlo do tumor do que o tratamento fraccionado: a velocidade de declínio da hiperprodução hormonal não é mais rápida do que no tratamento fraccionado; as complicações neurológicas descritas, são consideravelmente mais elevadas pelo menos em seguimentos a curto prazo. A menor irradiação de tecido normal cerebral obtida com a irradiação esterotáxica, parece ser uma evolução relevante, mas que requer a demonstração por benefícios clínicos e redução da

incidência de complicações tardias. A radiocirurgia tem indicações muito limitadas, só a pequenos resíduos tumorais afastados do quiasma óptico (revela-se particularmente útil nos resíduos junto ao seio cavernoso). Baseados nas actuais evidências, parece haver pequena justificação para o seu uso, uma vez que está associada a maior morbilidade, controlo inferior do volume tumoral e, nos tumores funcionantes, a um declínio hormonal não superior ao tratamento fraccionado. Assim sendo, esta técnica não pode ser recomendada como um tratamento apropriado para os tumores não funcionantes de qualquer dimensão e o seu papel nos funcionantes ainda é questionável. Para terminar é de salientar que o sucesso de qualquer técnica está largamente dependente do equipamento e do centro que a executa, pelo que os resultados nem sempre são passíveis de comparação.⁵¹⁰

Finalmente, nos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes não há estudos randomizados e controlados quanto à utilização da radioterapia como forma de diminuir ou estabilizar o tumor, e a decisão clínica mantém-se sem apoio em recomendações baseadas na evidência. A radioterapia como tratamento de primeira linha é excepcional e está reservado apenas para aqueles doentes que não tolerem a cirurgia. Mais comum é a sua utilização como tratamento coadjuvante da cirurgia. Alguns centros usaram a radioterapia de rotina após a cirurgia como terapêutica de consolidação, referindo excelentes resultados com um intervalo livre de doença de 10 anos em 90% dos doentes.^{487,518} Contudo esta prática foi caindo em desuso quer, devido ao crescimento indolente destes tumores quer aos seus efeitos a longo prazo, incluindo compromisso visual, disfunção cognitiva, aumento do risco cerebrovascular,⁵³³ aumento para o dobro do risco de tumores cerebrais secundários,⁵³⁴ e desenvolvimento de hipopituitarismo em mais de 50% dos doentes, com a sua potencial associação a maior mortalidade.⁵³⁵ Assim sendo, a radioterapia tem sido reservada para os tumores mais agressivos, com resíduos pós-operatórios maiores e com hipopituitarismo, ou para os tratados de forma conservadora que comecem a aumentar de volume. A sua eficácia nestas circunstâncias é difícil de estabelecer. Alguns autores referem um controlo do crescimento da massa tumoral em 91% dos doentes que foram irradiados logo após a cirurgia e em 78% dos doentes irradiados por recorrência do tumor.⁵³⁶ Outros autores referem uma taxa de controlo de 100% para os doentes tratados com radioterapia convencional, no momento de recorrência ou de progressão do tumor,⁴⁸⁷ e de 97% para este tipo de doentes tratados com radiocirurgia.⁵³⁷ Dado que as técnicas de radioterapia e de aquisição de imagem evoluíram muitíssimo, os efeitos secundários dos tratamentos mais recentes serão possivelmente menores. No entanto ainda não há recuo suficiente que permita afirmar a sua menor morbilidade. Uma vez que as indicações para a radioterapia ainda são matéria de discussão, a irradiação de cada doente com tumor da hipófise deve ser decisão de uma equipa multidisciplinar, envolvendo endocrinologistas, neurocirurgiões, radiologistas e radioterapeutas.

Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico dos tumores da hipófise, embora seja a pedra angular de diversos tumores funcionantes, não se tem revelado igualmente importante nos tumores clinicamente não funcionantes. Uma vez que a sua eficácia clínica tem sido muito limitada, os dados publicados envolvem geralmente pequenas amostras, o que dificulta ainda mais o estabelecimento do exacto papel desta abordagem nestes tumores.^{538,539,540}

Mais recentemente o tratamento com os agonistas da dopamina ganhou novo interesse sobretudo pela introdução da cabergolina e da associação da expressão dos receptores D2 aos seus efeitos, quer *in vitro* quer *in vivo*. Os receptores D2 são os receptores acoplados às proteínas G (GPCR) mais representados nos tumores da hipófise. Geralmente estão associados a dois ou mais subtipos de receptores da somatostatina, em função dos diferentes tipos de tumores: sst2 e sst5 nos somatotrofinomas, sst1 e sst5 nos prolactinomas, sst3 e sst2 nos tumores não funcionantes, e, finalmente sst5 nos corticotrofinomas.⁵⁴¹ Os tumores da hipófise clinicamente não funcionantes expressam, sobretudo, receptores D2, sst2 e sst3. Em cultura de células destes tumores, os agonistas dopaminérgicos e os análogos da somatostatina (preferencialmente sst2) inibem a síntese do ADN.^{542,561} Contudo no número limitado de estudos clínicos que avaliaram a eficácia destes agonistas em doentes com tumores não funcionantes, os resultados não foram encorajadores.⁵⁴³ O que tem sido intrigante é o facto do perfil de receptores identificado em determinado tipo de tumor, nem sempre estar correlacionado com a eficácia esperada do tratamento farmacológico correspondente. De facto, os agonistas dopaminérgicos têm-se revelado eficazes em mais de 90% dos prolactinomas,⁵⁴⁴ os análogos da somatostatina (octreotido e lanreotido) em cerca de 80% dos tirotrofinomas,^{545,546} mas apenas em 60% dos somatotrofinomas.^{547,548} Finalmente o papel dos agonistas da dopamina e dos análogos da somatostatina, no tratamento dos tumores clinicamente não funcionantes é *minor*, evidenciando um controlo destes tumores unicamente em cerca de 20%.⁵⁵³

O tratamento farmacológico dos tumores da hipófise teve início com a utilização da bromocriptina nos anos setenta do século XX. Trata-se de um agonista da dopamina que inibe a secreção de prolactina, o volume e o crescimento dos prolactinomas. Desde então passou a ser o tratamento de primeira linha para estes tumores, estando as outras formas de tratamento reservadas apenas para casos de resistência, intolerância ao tratamento farmacológico, emergência aguda ou preferência do doente. Estes fármacos foram também, a abordagem médica inicial da acromegalia e do gigantismo. Actualmente existem fármacos mais eficazes; contudo, nestes casos, ainda continua a ser pertinente a sua associação a outros tratamentos. Os agonistas dopaminérgicos podem ainda ser utilizados nos tumores não funcionantes e nos corticotrofinomas, mas a sua eficácia clínica é diminuta.

A maioria dos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes exprime receptores para a dopamina, sobretudo do subtipo 2 (*D2-like*).⁵⁴⁹ A secreção das gonadotrofinas é inibida *in vitro*⁵⁵⁰ e *in vivo*⁵⁵¹ estando a eficácia correlacionada com a expressão da isoforma curta

daqueles receptores.⁵⁴⁹ Contudo, a eficácia na redução do volume do tumor, comparativamente aos prolactinomas, é reduzida, inferior a 20%, possivelmente pela baixa expressão de receptores D2-like.⁵⁵² Recentemente Colao *et al.* analisaram 24 publicações sobre o tratamento com agonistas da dopamina de 199 tumores clinicamente não funcionantes.⁵⁵³ Houve redução do volume tumoral em 27,6% dos casos e melhoria dos campos visuais em 20,2%. O volume do tumor manteve-se estável em 63,8% e sofreu um aumento em 8,5% dos doentes. Outros autores, com a sua utilização após a cirurgia, obtiveram uma redução do volume ou estabilização do resíduo do tumor, em 90% dos doentes (dose média de bromocriptina 8 mg/dia) quando a terapêutica foi de imediato iniciada e como medida preventiva, e uma estabilização em 61,5% quando foi iniciada após a detecção de crescimento tumoral.⁵⁵⁴

Outros autores, usando a cabergolina durante um ano, obtiveram uma redução do volume do tumor em 56% dos casos, estando esta resposta associada a uma expressão dos receptores D2-like.⁵⁴⁹ A referência a complicações decorrentes da utilização de doses elevadas de cabergolina em doentes com doença de Parkinson, nomeadamente de doença cardíaca valvular, leva a algum cuidado na sua utilização.⁵⁵⁵ Análises recentes no tratamento dos tumores da hipófise não têm encontrado estes efeitos uma vez que são usadas doses muito inferiores.⁵⁵⁶ No entanto, a dose cumulativa, quando estes fármacos são usados por largos períodos de tempo e em doses mais elevadas, pode obrigar a uma vigilância mais apertada, nomeadamente com ecocardiograma.⁵⁵⁷ Apesar de ter sido demonstrado algum efeito dos agonistas dopaminérgicos nos tumores clinicamente não funcionantes, estes fármacos não são, em geral, uma boa alternativa à cirurgia quando é necessária uma descompressão imediata do quiasma óptico. O seu papel como tratamento adjuvante após uma cirurgia não radical, ainda permanece por estabelecer.⁴³⁵

Os análogos da somatostatina sugeriram na década de oitenta do século XX revelando-se muito úteis no tratamento dos somatotrofinomas ou dos tumores plurihormonais com secreção de GH, e em tumores secretores de TSH. Controlam simultaneamente a hipersecreção hormonal e reduzem o volume tumoral, embora a sua eficácia na redução do volume do tumor seja inferior à dos agonistas dopaminérgicos nos prolactinomas.

A expressão dos receptores da somatostatina nos tumores da hipófise é heterogénea. Nos tumores clinicamente não funcionantes os subtipos predominantes são o sst3 e sst2.^{558,559} A somatostatina inibe a secreção de cromogranina-A e da subunidade- α *in vitro*, e a sua resposta está positivamente correlacionada com a expressão dos sst2 e sst3.⁵⁶⁰ Os análogos da somatostatina^{561,562} mostraram-se capazes de diminuir a proliferação celular nos tumores hipofisários clinicamente não funcionantes, e o pasireotido⁵⁶³ também a viabilidade celular através da inibição da secreção do factor de crescimento do endotélio vascular. A eficácia do análogo da somatostatina (análogo preferencial sst2), octreotido, foi avaliada por Colao *et al.* em 100 tumores clinicamente não funcionantes durante um período médio de seis meses (1 a 12 meses).⁵⁵³ Verificou-se uma redução do volume do tumor em 5% dos casos, um aumento em 12% e estabilização em 83%. No entanto serão necessários seguimentos mais longos para determinar o verdadeiro papel destes fármacos no tratamento destes tumores. O facto dos tumores expressarem SSTRs e das células de

cultura de adenomas não funcionantes, em cultura, responderem aos análogos da somatostatina, não tem tido correspondência, de forma consistente, *in vivo*. A questão que se coloca, é o motivo desta discrepância. Três hipóteses foram apontadas: o papel dos sstr5 e do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF); o do *selective Alzheimer's disease indicator-1* (seladin); e o do Zac1.⁴¹¹

O VEGF e seu receptor foram encontrados sobre-expressos em tumores da hipófise clinicamente não funcionantes.⁵⁶⁴ Inexplicavelmente a estimulação dos receptores sstr5 resulta em uma proliferação destes tumores mas não na dos outros subtipos.⁵⁶² Os dados mais recentes sugerem que os tumores não funcionantes que não expressem os sstr5, evidenciam uma inibição da proliferação celular e redução da expressão do VEGF em resposta à somatostatina e pasireotido, enquanto que os que os expressem não evidenciam estes efeitos.⁵⁶³ Nos somatotrofinomas os análogos da somatostatina induzem a apoptose, mas não nos tumores clinicamente não funcionantes.

O seladin, um péptido sub-expresso nos neurónios afectados pela doença de Alzheimer, é conhecido por prevenir a apoptose via inibição da activação da caspase-3. Os tumores clinicamente não funcionantes evidenciam um aumento da expressão de seladin comparativamente aos somatotrofinomas o que poderia explicar a perda da eficácia da resposta apoptótica aos análogos da somatostatina.⁵⁶⁵

A Zac1 é uma proteína que regula a apoptose e a paragem do ciclo celular. Está altamente expressa nas células hipofisárias normais mas sub-expressa em alguns tumores da hipófise.⁵⁶⁶ Os análogos da somatostatina aumentam a expressão do gene Zac1 e o *knock-down* do Zac1 induz uma ausência de resposta aos análogos da somatostatina.⁵⁶⁷ Os receptores PPAR- γ foram identificados como alvos do gene Zac1, e a sua inibição reduz o efeito dos análogos da somatostatina, sugerindo que os PPAR- γ contribuem para o efeito antiproliferativo destes análogos.⁵⁶⁸ Nos tumores clinicamente não funcionantes verificou-se um aumento da expressão dos PPAR- γ ⁵⁶⁹ mas a redução do Zac1 pode diminuir os efeitos dos análogos da somatostatina na proliferação celular.⁵⁶⁸

O tratamento combinado com agonista da dopamina e análogo da somatostatina tem sido também proposto, baseado no aumento da actividade dos receptores secundariamente à heterodimerização dos receptores D2 e sst5.⁵⁷⁰ O composto quimérico somatostatina-dopamina ou dopastatina teve, *in vitro*, uma resposta equivalente à obtida pela cabergolina.⁵⁷¹ Até ao momento, a experiência em doentes é muito limitada, em número e em duração. Durante seis meses, foram tratados 10 casos de tumores clinicamente não funcionantes com a associação de octreotido de curta duração de acção e cabergolina, tendo havido uma redução do volume tumoral em 60% dos casos, o que parece correlacionado com a inibição da secreção das gonadotrofinas.⁵⁷² O efeito potencial de um análogo preferencial sst3 requer uma avaliação futura.

Tem sido demonstrado que o everolimus, um derivado da rapamicina e imunossupressor bem conhecido, inibe a via de sinalização celular mTor, levando a efeitos anti-proliferativos em um largo espectro de células tumorais,⁵⁷³ quer *in vitro* quer *in vivo*, incluindo tumores endócrinos.⁵⁷⁴ Foi demonstrado ter uma actividade anti-angiogénica

devido à inibição da secreção do VEGF.⁵⁷⁵ A expressão hipofisária do VEGF nos tumores clinicamente não funcionantes é superior à da hipófise normal⁵⁷⁶ e correlaciona-se com o aumento da proliferação.⁵⁷⁷ Por outro lado os análogos da somatostatina parecem mediar os seus efeitos anti-proliferativos também pela inibição da secreção do VEGF.⁵⁶³ Foi recentemente demonstrado que a rapamicina e o everolimus diminuíam significativamente a viabilidade celular *in vitro* de células secretoras de somatotrofina de modelos de experimentação animal e do humano.⁵⁷⁸ Nos tumores clinicamente não funcionantes o everolimus parece que reduz a viabilidade celular pela indução da apoptose, através de um mecanismo envolvendo a inibição da via de sinalização da IGF-1 e não pela inibição da secreção de VEGF.⁵⁷⁹ Recentemente foi igualmente demonstrado que o octreotido sensibilizava as células dos tumores clinicamente não funcionantes ao efeito antiproliferativo do inibidor mTOR, rapamicina.⁵⁸⁰ Por conseguinte, associações destas terapêuticas, podem vir a ser interessantes particularmente, para os tumores mais agressivos.

Outros fármacos foram usados no controlo dos sintomas de alguns tipos de tumor (como são exemplo as tiazolidinedionas na doença de Cushing), mas os resultados foram desapontadores. Mais recentemente têm sido também sugeridos os inibidores dos receptores da cinase da tirosina (gefitinib, lapatinib, etc.) como fármacos possivelmente indicados para os tumores da hipófise mais agressivos.⁵⁸¹

Para os tumores mais agressivos (aqueles adenomas invasivos ou atípicos que desenvolvem um comportamento resistente aos tratamentos instituídos e que condicionam uma morbilidade substancial) e para os carcinomas têm vindo a ser referidos outros fármacos, nomeadamente, o temozolomide.⁵⁸² Trata-se de um derivado imidazotetrazínico, agente que induz a metilação do ADN inibindo a sua replicação e que em alguns casos condiciona uma melhoria clínica, laboratorial e imagiológica com redução do tumor. Contudo, a sua actividade citotóxica parece depender da expressão da *O-6 metil-guanin-DNA metil transferase* (MGMT) uma vez que induz a sua depleção. Se esta enzima de reparação do ADN tiver uma expressão baixa ou negativa, os tumores respondem, se for elevada serão resistentes. Assim, a imuno-reactividade da expressão da MGMT poderá permitir prever quais os tumores que irão responder melhor a este tipo de tratamento. No entanto, uma vez que o valor de corte para a expressão da MGMT ainda não foi determinado, parece ser precoce estabelecer uma correlação entre a expressão da MGMT e a metilação do promotor ou entre a presença da metilação e a resposta ao temozolomide.⁵⁸² É importante referir que qualquer resposta, hormonal ou tumoral, é rapidamente observada, logo após o início do tratamento, nos indivíduos respondedores. De facto, a ausência de resposta após três ciclos consecutivos prediz uma futura resistência ao temozolomide. Contudo, também é de sublinhar, que uma resposta inicial pode ser seguida de um escape após cinco a seis meses da sua introdução.⁵⁸² O temozolomide também inibe a angiogénese do tecido tumoral, mas o mecanismo exacto pelo qual induz este efeito ainda não está esclarecido.⁵⁸³ Assim sendo, o temozolomide parece ser um agente promissor nos carcinomas ou tumores agressivos, embora o seu

efeito pareça estar dependente de níveis baixos de expressão da enzima de reparação do ADN, a MGMT. No entanto, de momento, os estudos efectuados revelaram que a expressão da MGMT é ainda um fraco factor preditivo da resposta ao tratamento, pelo que não deve ser usado para a selecção dos doentes que possam beneficiar com esta terapêutica. Alguns autores propõem ainda que se interrompa o tratamento na ausência de resposta hormonal ou do volume tumoral após três ciclos, uma vez que uma resposta mais tardia parece pouco provável.⁵⁸²

Tratamento do hipopituitarismo

A prevalência do hipopituitarismo nos tumores clinicamente não funcionantes é elevada, sendo, no mínimo, de cerca de 50% (e se houver uma avaliação formal da função hipofisária esta será ainda maior).⁴⁰⁴ Pode estar presente antes da cirurgia ou radioterapia com manutenção ou agravamento após estas abordagens; contudo, há casos de reversão parcial ou total. É de extrema importância um tratamento hormonal de substituição, de forma a diminuir a morbilidade e mortalidade.

O hipopituitarismo consiste em um estado permanente de insuficiência, parcial ou completa da função hipofisária. A identificação das deficiências hormonais é de importância vital, particularmente no caso da prevenção de uma insuficiência aguda cortico supra-renal. O tratamento é substitutivo (nem sempre de fácil reprodução fisiológica). No entanto, apesar da instituição do tratamento hormonal convencional, diversos trabalhos relatam um aumento da incidência de doença (cérebro) vascular e mesmo um aumento da mortalidade. Para além deste aspecto, muitos doentes tratados por deficiências endócrinas continuam a manifestar diversos sintomas mais ou menos vagos e diminuição da qualidade de vida.⁵⁸⁴

3.6. Efeitos a longo prazo

Diversos estudos verificaram que os doentes com tumores clinicamente não funcionantes tinham importantes repercussões na sua qualidade de vida. Foram descritos aumento da fadiga física e mental, redução da motivação, energia e função social, bem como diminuição da percepção geral de bem-estar e saúde.^{585,586} O hipopituitarismo e o género feminino foram as variáveis mais associadas com a menor qualidade de vida.⁵⁸⁶ O papel específico da radioterapia não é perfeitamente claro devido a múltiplas variáveis confundidoras e resultados divergentes.^{586,587,588} O papel da terapêutica de substituição sub-ótima do hipopituitarismo é de avaliação difícil, uma vez que todas as terapêuticas de substituição hipofisárias não reproduzem os perfis plasmáticos normais da pessoa saudável.⁵⁸⁹ Estas imperfeições intrínsecas da substituição podem resultar em desarranjos subtis da fisiologia que podem ser igualmente implicados na perda de qualidade de vida.⁴³⁵ A taxa de mortalidade padronizada parece estar aumentada nos tumores clinicamente não funcionantes, particularmente no sexo feminino (risco relativo 1,97).⁵⁹⁰ A elevada taxa de hipopituitarismo nestes doentes será provavelmente um importante factor de

contribuição para esta constatação, esta que no entanto, não é corroborada por todos.⁵⁹¹ O grande intervalo de confiança dos diversos estudos sobre esta questão não permite tirar uma conclusão definitiva sobre a existência ou não de aumento de mortalidade nestes doentes após tratamento, com tumores da hipófise clinicamente não funcionantes.^{435,592}

3.7. Estratégias globais de tratamento e de seguimento

Não existem estudos comparativos e prospectivos de avaliação do impacto das diferentes estratégias terapêuticas e de seguimento dos tumores hipofisários clinicamente não funcionantes na qualidade de vida, morbidade e mortalidade. Assim sendo, as recomendações não são rígidas nem baseadas na evidência. Face a esta dificuldade, e na ausência de marcadores seguros da sua evolução, estes devem ter um seguimento de longo prazo, para toda a vida.

Segundo alguns autores é, de alguma forma consensual, que tumores que não excedam os 15 mm, sem compromisso óptico e assintomáticos, possam ser seguidos de forma conservadora. A presença de compressão das estruturas ópticas, de cefaleias severas ou de hipopituitarismo são indicações para cirurgia. Os tumores com extensão supra-selar ou para-selar são igualmente indicação para cirurgia devido ao seu elevado potencial de crescimento.⁴⁰⁴

Nos casos em que a opção de tratamento foi a conservadora, dever-se-á avaliar a função hipofisária a cada seis meses. A ressonância magnética da região selar será repetida anualmente. Se não houver progressão do tumor poder-se-á alargar para uma periodicidade de dois em dois anos. O intervalo para o estudo oftalmológico depende da proximidade do tumor ao quiasma óptico, e da clínica que o doente possa apresentar.⁴³⁵

Quando houve remoção cirúrgica macroscopicamente total, os doentes podem ser seguidos conservadoramente uma vez que estes tumores têm, habitualmente, um crescimento indolente. Nos doentes em que ficaram resíduos tumorais significativos, mas sem compressão de estruturas nobres adjacentes, também se pode optar por uma atitude conservadora atendendo ao baixo potencial de crescimento, embora o risco de progressão do tumor seja maior. A terapêutica com agonistas da dopamina poder-se-á usar em uma tentativa de atrasar a recorrência ou progressão do tumor embora os resultados sejam muito duvidosos. A re-intervenção cirúrgica está indicada quando os resíduos são de grandes dimensões ou existe compromisso das estruturas envolventes, nomeadamente do quiasma ou dos nervos ópticos. A radioterapia deve ser ponderada quando há recidivas e em casos de rápido crescimento tumoral para diminuir ou impedir a sua progressão ou quando persistem importantes resíduos tumorais a uma re-intervenção cirúrgica.⁴⁰⁴

Como já referido, todos os doentes devem ter um seguimento prolongado, para a vida, embora a forma e a periodicidade não estejam perfeitamente estabelecidas, estando

dependentes do julgamento clínico. A ressonância magnética no pós-operatório imediato (ou intra-operatória) tem como indicação a avaliação da sua eficácia e o diagnóstico de complicações. No entanto, numa fase muito precoce de ressecção do tumor, poderá não ser visível a redução do seu volume devido à existência de material de preenchimento, de resíduos pós-operatórios, de espessamento das mucosas e de focos de hemorragia.⁵⁹³ Com o tempo (em meses), parte destes aspectos resolvem-se, o material de preenchimento é reabsorvido, levando à melhor avaliação da redução do volume tumoral. Face a isto, e devido ao facto das alterações pós-operatórias se resolverem, é aconselhável realizar a ressonância magnética cerca de quatro meses após.^{431,435} Uma segunda ressonância após a cirurgia deverá ser efectuada um ano após o tratamento inicial. Seguidamente, e dependendo das características individuais, como o volume do resíduo tumoral e sua distância ao quiasma óptico, tem sido referido que é razoável realizar uma ressonância anual nos primeiros três a cinco anos e posteriormente menos frequentemente se não houver recorrência ou progressão do tumor. A observação oftalmológica, com realização de campimetria, deve ser efectuada algumas semanas após a cirurgia e subsequentemente após um e dois anos para estimar o efeito final do tratamento cirúrgico na visão. Os tumores com recorrência de localização junto ao quiasma óptico devem ser avaliados a cada seis a doze meses. O estudo oftalmológico como método de avaliação de recidiva tumoral tem limitações, especialmente nos doentes com tumores que apresentem uma apreciável distância do quiasma óptico;⁴³⁵ por outro lado, as dificuldades de colaboração também podem dificultar este tipo de vigilância. A função hipofisária deve ser avaliada anualmente quando há progressão do tumor ou radioterapia prévia, uma vez que pode vir a ficar comprometida.⁴⁰⁴

Concluindo, apesar dos avanços na caracterização citogenética e biomolecular dos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes, nas técnicas de imagem, de cirurgia e de radioterapia, as estratégias óptimas de tratamento e de seguimento ainda não foram completamente estabelecidas. São necessários mais estudos controlados, quer com os tratamentos disponíveis quer com novas abordagens, de forma a estabelecer uma estratégia de tratamento e de seguimento óptimos.⁴⁰⁴

3.8. Prognóstico

Estabelecer um prognóstico na patologia da hipófise continua a ser um dos maiores desafios do endocrinologista. A actividade de proliferação avaliada por marcadores como o antigénio nuclear de proliferação celular, Ki-67/MIB-1, e o marcador anti-apoptótico Bcl-2 infelizmente não demonstraram correlação absoluta com o grau de invasão e de recorrência. É certo que os carcinomas têm estes indicadores fortemente positivos (Ki-67>10% e p53 positivo), com um tempo médio de sobrevivência inferior a quatro anos,⁵⁹⁴ mas não deixam de ser a raridade, as situações de excepção. Fica assim a quase totalidade destes tumores sem marcadores seguros do seu comportamento biológico. A classificação

dos tumores baseada no conteúdo hormonal e estrutura celular, continua assim a ser o mais importante embora não determine a sua evolução e comportamento biológico.

3.9. Conclusão

Os tumores da hipófise são uma patologia que exige uma abordagem envolvendo diversas especialidades, requerendo o reconhecimento de diversas entidades patológicas. No passado, o diagnóstico de 'adenoma' era suficiente para a maioria dos clínicos mas com os avanços da neuroendocrinologia e da biologia molecular tornou-se necessário um diagnóstico clínico-patológico mais preciso bem como um tratamento e seguimento mais orientados. Indicadores seguros do seu comportamento biológico e prognóstico permanecem ainda largamente por estabelecer.

II. OBJECTIVOS

O tratamento e seguimento dos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes, como já mencionado, são um desafio revestido de diversas dificuldades para o clínico. Na ausência de síndromes clínicas bem definidas de hipersecreção hormonal, os doentes habitualmente apresentam-se com sintomas decorrentes da extensão e invasão das estruturas vizinhas. Neste estágio, a abordagem destes tumores raramente é curativa. Por outro lado não há marcadores seguros indicativos da permanência e progressão ou da capacidade de recorrência do tumor; o tratamento farmacológico tem sido, na maioria das situações ineficaz, e a radioterapia tem um significativo risco de efeitos secundários. Assim sendo o seguimento e a avaliação da necessidade de intervenção têm essencialmente assentado no estudo imagiológico periódico. Do conhecimento actual sabe-se que, se por um lado as células tumorais mantêm a sua capacidade de proliferação, também é verdade que muitos destes tumores têm uma evolução tão indolente que podem não levar à necessidade de intervenção durante a vida do doente. Foi no sentido de contribuir para um melhor esclarecimento da história natural e de critérios de orientação dos doentes com estes tumores que este estudo foi desenhado.

Refere-se se que a maior ênfase foi dada aos aspectos clínicos, uma vez que são a realidade diária de um médico que segue e trata doentes com tumores da hipófise. O estudo molecular resultou de uma consequência natural daquela actividade e da inquietação científica na procura de novos conhecimentos resultantes do acompanhamento dos estudos efectuados nos últimos trinta anos.

Este trabalho teve assim dois objectivos principais e um adicional:

1. Objectivos principais

1.1. Identificação de factores clínicos envolvidos no comportamento biológico dos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes, com ênfase especial para os factores associados à progressão ou à recorrência.

1.2. Identificação de factores moleculares de predisposição envolvidos na interacção genes e meio ambiente nos diferentes tipos de tumores da hipófise, funcionantes ou não funcionantes.

2. Objectivo adicional

2.1. Contribuição para o esclarecimento da etiopatogenia e história natural dos tumores da hipófise com potenciais implicações, no tratamento, na redução da progressão ou recorrência e nas complicações terapêuticas, com vista à melhoria da qualidade de vida dos doentes com esta patologia.

III. MATERIAL E MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO

Para que os objectivos propostos fossem atingidos foram realizados dois tipos de estudos, um estudo clínico e um estudo molecular. No estudo clínico procedeu-se à análise dos dados clínicos de doentes com tumores da hipófise clinicamente não funcionantes, de forma a identificar os que pudessem estar envolvidos na capacidade clínica de predizer o seu comportamento e determinar o seu prognóstico. No estudo molecular foi avaliado o papel dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1*, nos diversos tipos de tumores, de forma a identificar genótipos ou conjunto de genótipos que pudessem influenciar a susceptibilidade para o seu desenvolvimento, face à interacção com factores ambientais; procedeu-se ainda à verificação da ocorrência de mutações germinais do gene *AIP* em somatotrofinomas ou mamossomatotrofinomas diagnosticados em idade precoce, e que pudessem igualmente conferir uma susceptibilidade ou um comportamento biológico diferentes para estes tumores.

1. Instituições envolvidas

1. Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo
(Directora: Professora Doutora Manuela Carvalheiro)
Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE
3000-075 Coimbra
Tel: +351 239 400 423
Fax: +351 239 825 879
Email: endocdiab@huc.min-saude.pt
2. Serviço de Neurologia
(Director: Professor Doutor Luís Cunha)
Laboratório de Neuropatologia
(Responsável: Dr^a. Olinda Rebelo)
Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE
3000-075 Coimbra
3. Serviço de Anatomia Patológica
(Directora: Professora Doutora Manuela Lacerda)
Laboratório de Patologia Molecular
(Responsável: Professora Doutora Teresa Martins)
Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil
Centro Regional de Oncologia de Coimbra, EPE
3000-075Coimbra
Tel: +351 239 400 200
Fax: +351 239 484 317

4. Serviço de Genética Médica
(Responsável: Professor Doutor Fernando J. Regateiro)
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
3004-504 Coimbra
Tel: +351 239 825 861
Fax: +351 239 823 236

5. Department of Endocrinology
(Professor Doutor Ashley Grossman, Professor de Neuroendocrinologia)
St Bartholomew's Hospital and the Royal London School of Medicine and Dentistry
London EC1A, UK
Tel: + 44-2076018343
Fax: + 44-2076018505
Email: a.b.grossman@qmul.ac.uk

2. Populações

2.1. Doentes

Foram considerados os doentes com tumores da hipófise seguidos no Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos Hospitais da Universidade de Coimbra, EPE. Os doentes foram recrutados das Consultas especializadas de Tumores da Hipófise I (destinada ao seguimento dos somatotrofinomas, corticotrofinomas, craniofaringeomas) e Tumores da Hipófise II (destinada ao seguimento dos tumores clinicamente não funcionantes, prolactinomas e tumores para-selares), do Internamento e do Hospital de Dia. Com esta população foi desenhado um estudo clínico, nos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes, e molecular nos diferentes tipos de tumores.

Em todos procedeu-se à obtenção do seu consentimento informado, respeitando as normas das Comissões de Ética das Instituições envolvidas.

Foram constituídos três tipos de populações com tumores da hipófise, de acordo com os estudos efectuados, clínico e molecular.

2.1.1. Amostra para o estudo clínico

A investigação clínica teve como base a análise retrospectiva de processos clínicos de 236 doentes (130 do sexo feminino e 106 do sexo masculino, idade média de $54,9 \pm 16,1$ anos) com o diagnóstico de 'tumor da hipófise clinicamente não funcionante', diagnosticados entre 1970 e 2009.

2.1.2. Amostra para o estudo molecular dos genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1*

A investigação molecular dos genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada em 235 doentes (151 do sexo feminino e 84 do sexo masculino, idade média de $50,1 \pm 15,3$ anos) com tumores aparentemente esporádicos da hipófise de diversos tipos (65 tumores não secretores, 64 somatotrofinomas ou mamossomatotrofinomas, 58 macroprolactinomas, 27 corticotrofinomas, 12 gonadotrofinomas, 2 tirotrofinomas, 2 pluri-hormonais e 5 clinicamente não funcionantes). Todos caucasianos e oriundos da zona centro de Portugal.

2.1.3. Amostra para o estudo molecular do gene *AIP*

A investigação molecular do gene *AIP* foi efectuada em 20 doentes (12 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, idade média no momento do diagnóstico de $25,7 \pm 5,0$ anos) com somatotrofinomas ($n=12$) e mamossomatotrofinomas ($n=6$), aparentemente esporádicos e diagnosticados antes dos 35 anos de idade. Todos caucasianos e oriundos da zona centro de Portugal.

2.2. População de controlo

Foi apenas constituída uma população de controlo para o estudo molecular dos genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1* e que constou de 256 indivíduos saudáveis (106 do sexo feminino e 150 do sexo masculino, idade média $36,8 \pm 13,7$ anos), caucasianos, oriundos da zona centro e recrutados nos Hospitais da Universidade de Coimbra e na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Esta população foi constituída por alunos, funcionários e dadores de sangue. A diferença de idades entre os doentes e o grupo controlo não foi considerada relevante uma vez que estudos prévios tinham mostrado não haver correlação entre a idade e o genótipo.^{595,596}

3. Métodos de investigação e desenho dos estudos

3.1. Estudo clínico

- 3.1.1. História clínica
- 3.1.2. Estudo bioquímico e hormonal
- 3.1.3. Estudo neurorradiológico
- 3.1.4. Tratamento
- 3.1.5. Estudo neuropatológico
- 3.1.6. Evolução
- 3.1.7. Progressão ou recorrência do tumor

Entre 1970 e 2009 foram diagnosticados e observados no Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC, EPE, 236 doentes com tumores da hipófise clinicamente não funcionantes. O diagnóstico baseou-se na ausência de síndrome clínica de hipersecreção hormonal e no estudo histopatológico. Procedeu-se a uma recolha retrospectiva dos dados clínicos e à sua análise em todos os doentes.

Foram recolhidos: idade de diagnóstico, género, forma de apresentação e seus sintomas e sinais, estudo hormonal antes e após tratamento, estudo oftalmológico antes e após tratamento, caracterização do tumor pela conjugação da informação neurorradiológica, cirúrgica e histopatológica (maior diâmetro, classificação de Hardy, extensão ou invasão supra, para e infra-selar, presença de necrose, de áreas quísticas e de hemorragia), tratamento cirúrgico (tipo de abordagem, número de cirurgias, remoção macroscópica total *versus* remoção parcial após a primeira cirurgia), efeitos secundários do tratamento cirúrgico, radioterapia e seus efeitos secundários, presença de outros tumores associados e seguimento (tempo de seguimento, doentes perdidos para o seguimento e mortalidade). Nem todos os doentes apresentavam, nos seus processos clínicos, todas as variáveis referidas pelo que, quando pertinente, se refere o número de doentes em que a totalidade das variáveis em análise estiveram presentes.

3.1.1. História clínica

Os dados clínicos foram obtidos por consulta do processo único clínico hospitalar. O estudo oftalmológico foi efectuado, maioritariamente no Serviço de Oftalmologia dos HUC, EPE tendo sido pesquisadas a acuidade visual, a avaliação dos fundos oculares, os campos visuais [inicialmente de forma manual e posteriormente computadorizados (perimetria de Goldmann ou de Humphrey)] e a presença de parésias dos pares cranianos relacionados (III, IV, V e VI pares). A avaliação neuro-oftalmológica foi efectuada antes e após as intervenções terapêuticas, e durante o seguimento, com uma periodicidade variável de acordo com as manifestações clínicas e com o tumor ou resíduo tumoral em causa.

3.1.2. Estudo bioquímico e hormonal

O estudo da função hipofisária envolveu uma avaliação hormonal basal e provas dinâmicas dos eixos hipófise-glândulas alvo, à data do diagnóstico, antes dos procedimentos terapêuticos, aproximadamente um a dois meses após a cirurgia, e anualmente após a radioterapia.

O diagnóstico de insuficiência gonadal secundária foi estabelecido, em mulheres pré-menopáusicas por amenorreia superior a um ano, e nos homens por níveis sub-normais de testosterona, acompanhados em ambos os sexos de níveis diminuídos ou normais de gonadotrofinas; na mulher pós-menopáusica, por gonadotrofinas diminuídas ou inapropriadamente normais. Em alguns casos foi efectuada a prova da gonadoliberina (GnRH), considerando-se compatível com o diagnóstico uma resposta ausente ou diminuída das gonadotrofinas à estimulação.

O diagnóstico de insuficiência tiroideia secundária foi estabelecido pela presença de níveis diminuídos de tiroxina livre, associados a uma tirotrófina normal ou suprimida. A prova da tiroiberina (TRH) foi considerada patológica na ausência da estimulação da tirotrófina ou quando houve uma resposta tardia da tirotrófina (valor da tirotrófina mais elevado aos 60 minutos do que aos 20 minutos).

O diagnóstico de insuficiência cortico supra-renal secundária foi estabelecido na presença de cortisol às 8h inferior a 3 µg/dL ou um cortisol sérico inferior a 18 µg/dL após estimulação com o tetracosactídeo (250 µg, ev) ou inferior a 20 µg/dL na prova da hipoglicemia insulínica (0,1 U de insulina de acção curta/kg peso, ev) associado a uma ACTH normal ou diminuída.

A deficiência de somatotrofina foi estabelecida na presença de dois eixos hormonais antehipofisários insuficientes associados a IGF1 sub-normal para a idade e sexo, ou perante um valor de somatotrofina após estimulação na prova da hipoglicemia insulínica inferior a 3 µg/dL.

A hiperprolactinemia foi definida por um valor superior a 20 ng/mL. A insuficiência antehipofisária global foi considerada na presença de deficiência dos eixos somatotrófico, gonadal, tiroideu e cortico supra-renal. A diabetes insípida foi estabelecida como definitiva perante a permanência, ao fim de pelo menos um ano, de uma síndrome poliúrica-polidipsica acompanhada de um valor de densidade e osmolalidade urinárias diminuídos.

O doseamento das hormonas da hipófise anterior foi realizado recorrendo a *kits* comercializados para o efeito. Os métodos de doseamento foram variando ao longo do tempo. O doseamento tem sido determinado por métodos imunológicos baseados em uma reacção antigénio-anticorpo. As técnicas inicialmente efectuadas foram de imuno-reactividade (RIA) com anticorpos monoclonais. Progressivamente houve um aperfeiçoamento da sua sensibilidade e especificidade pela introdução de métodos de doseamento do tipo *sandwich* (IRMA). Posteriormente, e devido à dificuldade da sua automatização, foram desenvolvidos outros métodos, nomeadamente, imunoenzimáticos (EIA), imunofluorescentes (IFA) e imunoquimioluminescentes (ICMA). Estes últimos constituíram, na última década, o método de eleição, uma vez que substituíram com vantagem os métodos imuno-reactivos, devido à automatização, maior validade do reagente, celeridade de execução bem como maior sensibilidade e especificidade.

3.1.3. Estudo neurorradiológico

O estudo neurorradiológico incluiu a radiografia simples, a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM). A pneumoencefalografia foi usada em escassos doentes antes da era da TC. Os Hospitais da Universidade de Coimbra passaram a ter TC a partir de 1987, inclusive, e RM em 1992. Previamente a estas datas, foram realizadas TC na década de oitenta e RM, na década de oitenta e noventa em centros privados. A técnica de eleição foi a ressonância magnética da região selar mas só regularmente realizada desde que passou a estar disponível nos HUC. Desde então todos os doentes a efectuaram antes da cirurgia, mesmo que já tivessem sido estudados por uma tomografia axial computadorizada. Previamente a esta data os doentes eram submetidos a cirurgia apenas com a tomografia

axial computadorizada da região selar. Foram poucos, os casos diagnosticados na década de setenta, em que apenas foi realizada radiografia simples da região selar ou pneumoencefalografia. Na RM são efectuados planos sagitais e coronais em T1 e planos coronais em T2, antes e após administração endovenosa de gadolínio. Para avaliação do encéfalo, em casos seleccionados, pode ainda ser realizada uma sequência adicional em T2. Uma vez que muitos doentes, particularmente nas imagens efectuadas há mais anos, não dispunham nem dos exames nem das três dimensões do tumor (longitudinal, transversal e antero-posterior) foi considerado apenas o maior diâmetro referido, independentemente de qual o diâmetro. O volume não foi calculado pela razão atrás mencionada. Os tumores foram classificados de acordo com a classificação radiológica de Hardy em grau I, II, III e IV. A invasão dos seios cavernosos, óssea, e do seio esfenoidal bem como a presença de hemorragia, necrose e áreas quísticas foram individualmente registadas e analisadas.

3.1.4. Tratamento

O tratamento de eleição destes tumores tem sido, até ao momento, cirúrgico. Alguns casos não foram operados por critérios de impedimento ou de não indicação formal, inerentes ao próprio doente (idade avançada, co-morbilidades importantes, tumores sem compromisso visual, recusa do doente) ao tumor (hemorragia e apoplexia) ou por abandono após o diagnóstico. Nestes o tratamento instituído foi apenas observação e tratamento das insuficiências hipofisárias associadas.

O procedimento cirúrgico foi efectuado na quase totalidade dos doentes como tratamento de primeira linha, e ainda nas situações de progressão ou de recorrência. Inicialmente foi realizado por diferentes neurocirurgiões; a partir de 1989 por uma equipa composta por dois neurocirurgiões mais vocacionados para esta patologia. A via transesfenoidal assistida por microscópio (sub-labial ou transnasal), introduzida nos anos oitenta, foi a mais usada. Nesta amostra não há doentes que tenham sido submetidos a cirurgia por via transesfenoidal assistida por endoscopia.

A radioterapia foi realizada em diferentes locais (IPO-FG-Coimbra, HUC-EPE, centros privados de radioterapia de Lisboa e do Porto). Foi efectuada como terapêutica coadjuvante da primeira cirurgia ou devido a progressão ou recorrência do tumor, após a primeira cirurgia ou após outras re-intervenções cirúrgicas. Em nenhum doente foi a terapêutica de primeira linha. As técnicas usadas foram a da radioterapia convencional fraccionada em três campos (lateral esquerdo, lateral direito e anterior). Nos casos mais antigos foi ainda usada a radioterapia externa convencional em dois campos. A dose de radiação variou entre 4500 a 5400 cGy, com uma média de 4883 cGy. A dose diária por sessão foi de 1,8 cGy a 2 cGy, 5 dias por semana, em um total de 28 a 30 sessões.

3.1.5. Estudo neuropatológico

Para o diagnóstico histopatológico efectuaram-se cortes histológicos a 4 micra de espessura dos fragmentos do tumor e as lâminas foram coradas pela hematoxilina e eosina e PAS. Os tumores foram inicialmente classificados de acordo com a sua coloração em basófilos, eosinófilos e cromófbos, uma classificação claramente insuficiente, como mais tarde se veio a demonstrar. Estes adenomas, particularmente os cromófbos, sem expressão clínica ou bioquímica de hiperprodução hormonal foram denominados de tumores clinicamente não funcionantes. Desde 1993, passou a ser efectuado o estudo imunohistoquímico com a utilização de anticorpos comerciais para as diferentes hormonas da hipófise anterior, de acordo com o descrito. Foi usada a técnica de imunoperoxidase esterepavidina-biotina usando os anticorpos monoclonais para a somatotrofina (GH, diluição 1:100, da Zymed); prolactina (PRL, diluição 1:100, da Zymed); corticotrofina (ACTH, diluição 1:100, da Dako); tirotrofina (β -TSH, diluição 1:50, da Dako); hormona foliculoestimulante (β -FSH, diluição 1:50, da Dako); hormona luteinizante (β -LH, diluição 1:100, da Zymed); e subunidade- α (SU- α , diluição 1:100, da Dako). A imunocoloração foi ainda efectuada usando os anticorpos MIB-1 (diluição 1:100, da Novocastra/Leica) para o antígeno nuclear Ki-67 e para a proteína p53 quando indicada (p53, diluição 1:50, da Novocastra/Leica).

A imunopositividade inferior a 10% foi considerada o valor de corte para a expressão hormonal negativa. Os tumores com uma positividade superior a 5% a 10% para as gonadotrofinas (FSH, LH e subunidade- α) foram classificados de gonadotrofinomas. Os tumores com uma positividade inferior a esta, mas com alguma positividade para aquelas hormonas, foram também sujeitos a uma sub-análise tendo sido igualmente considerados como gonadotrofinomas. Este pressuposto teve como base o facto de actualmente se acreditar que a maioria dos tumores não secretores tem origem na célula gonadotrófica.⁴¹¹ Os tumores com positividade para a TSH, ACTH, PRL e GH foram classificados como positivos ou negativos para uma ou mais das diferentes hormonas. Os positivos foram os considerados silenciosos para estas hormonas.

Como já referido, o índice de proliferação celular pelo antígeno Ki-67, proteína nuclear, foi avaliado pelo índice de marcação do anticorpo monoclonal MIB-1. Este só passou a ser efectuado por rotina mais recentemente, desde 2004/2005. Foi calculado pela percentagem de núcleos marcados por 1.000 células, nas áreas de maior proliferação celular. Tem tido uma avaliação semi-quantitativa não automatizada (inferior a 1%, inferior a 3%, superior a 3%) dada a escassez de recursos humanos e técnicos. Quando em presença de um tumor com aumento significativo de mitoses ou Ki-67 superior a 3% (adenoma atípico) procedeu-se à pesquisa da expressão nuclear da proteína p53.

A descrição de invasão óssea, presença de hemorragia, de necrose e de áreas quísticas foram registadas para melhor caracterização do tumor.

3.1.6. Evolução

O controlo do tumor foi efectuado por monitorização clínica, estudo hormonal, oftalmológico e neurorradiológico. O seguimento imagiológico foi efectuado por TC (inicialmente e nos casos mais antigos) ou RM da região selar 3 a 6 meses após a cirurgia, aproximadamente anual nos primeiros cinco anos e posteriormente de dois em dois ou de três em três anos. Esta periodicidade foi mais alargada ou encurtada dependendo do doente e do comportamento do tumor em causa. A remoção cirúrgica ‘macroscópica total’ foi considerada de acordo com o relatório do procedimento cirúrgico e quando na imagem três meses após a cirurgia não era evidente a presença de resíduo tumoral visível. Nos restantes casos considerou-se ter havido uma remoção parcial. A duração do seguimento foi calculada pelo intervalo entre o diagnóstico imagiológico e a data da última observação.

3.1.7. Progressão ou recorrência do tumor

O estabelecimento do critério de progressão ou de recorrência foi de extrema importância uma vez que foi com base neste critério que se tentou encontrar marcadores do comportamento biológico destes tumores. No entanto a sua definição nem sempre é fácil. Há imagens sugestivas de resíduo tumoral que são duvidosas e que podem mimetizar apenas material e tecido cicatricial cirúrgico, e há resíduos de tumor que são diminutos e não sofrem progressão significativa.

Assim sendo optou-se, para definição de progressão ou recorrência do tumor, por critérios o mais possível objectivos: progressão do crescimento do tumor que levou à necessidade de pelo menos uma segunda intervenção, que incluiu a repetição de remoção cirúrgica ou realização de radioterapia; e quando estava presente um resíduo tumoral com componente importante extra-selar (supra-selar em todos), podendo estes, por diversos motivos, não terem sido submetidos a segunda intervenção. Estes critérios foram adoptados por parecerem mais objectivos, sensíveis e de maior significado clínico na avaliação da progressão da doença. O tempo de progressão ou de recorrência foi determinado pelo intervalo entre a primeira cirurgia e o segundo evento terapêutico (cirurgia ou radioterapia) ou a data da imagem documentadora dessa progressão ou recorrência nos casos não operados. Nos doentes sem progressão ou recorrência do tumor este tempo foi calculado entre a cirurgia ou entre a cirurgia e radioterapia coadjuvante e a última imagem efectuada.

3.2. Estudo molecular

3.2.1. ADN germinal

A cada indivíduo incluído nos estudos moleculares foram colhidos 10 mL de sangue venoso periférico e distribuídos por tubos com o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético). O isolamento de ADN germinal, a partir dos leucócitos, foi realizado recorrendo a *kits* comercializados para o efeito. A cada amostra de ADN foi atribuído um número de registo, preservando-se o anonimato, e posteriormente armazenadas a -70°C.

3.2.2. Análise molecular dos genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1*

O estudo dos genes *CYP2D6*, *GSTM* e *GSTT1* no ADN obtido a partir de leucócitos de sangue periférico, foi realizado no Serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra com a supervisão e colaboração do Professor Doutor Fernando Regateiro e Professor Doutor Manuel Lemos. Sempre que solicitada a Professora Doutora Henriqueta Breda mostrou-se igualmente disponível.

Gene CYP2D6

A detecção da transição c.506,-1g>a, polimorfismo genético mais frequente do gene *CYP2D6*, correspondente ao alelo recessivo metabolizador 'lento' *CYP2D6*4*, foi realizada por amplificação do ADN germinal seguida por digestão pela enzima de restrição *BstN1*, em conformidade com os procedimentos previamente publicados.^{597,598}

Para cada indivíduo, procedeu-se à amplificação por técnicas de PCR, de um fragmento do gene *CYP2D6* com 334pb de comprimento contendo o local polimórfico. O sucesso da amplificação foi confirmado pela electroforese de uma amostra em um gel de agarose. A distinção entre alelos normais e mutados foi realizada recorrendo à restrição enzimática com a endonuclease *BstN1*. Foram utilizados 100 a 200 ng de ADN num volume de reacção de 50 µL contendo 150 ng do *primer* (P1) 5'-GCTTCGCCAACCACTCCG-3', 150 ng do *primer* (P2) 5'-AAATCCTGCTCTCCGAGGC-3', 1U de *Taq* ADN polimerase, 200 µM de cada dNTP, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0) e 5,0% DMSO. Após uma desnaturação prévia a 94°C durante 5 minutos, realizaram-se 30 ciclos constituídos por desnaturação a 94°C durante 1 minuto, ligação a 60°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 2 minutos. Digeriram-se 20 µL do produto da PCR com 5U da *BstN1* durante 12 a 16 horas a 60°C e procedeu-se à separação dos fragmentos resultantes por electroforese num gel de poliacrilamida a 8% que após coloração com brometo de etídio foi visualizado com luz ultra violeta e fotografado. A presença da transição c.506,-1g>a destrói o local de restrição para a *BstN1* resultando em fragmentos intactos enquanto que a ausência dessa transição origina a clivagem do fragmento inicial em dois fragmentos de 230pb e 104pb, respectivamente (figura 1).

Isto permitiu classificar os doentes e controlos em metabolizadores activos homozigotos (*CYP2D6*1/CYP2D6*1*), heterozigotos (*CYP2D6*1/CYP2D6*4*) e em metabolizadores 'lentos' homozigotos (*CYP2D6*4/CYP2D6*4*).⁵⁹⁹

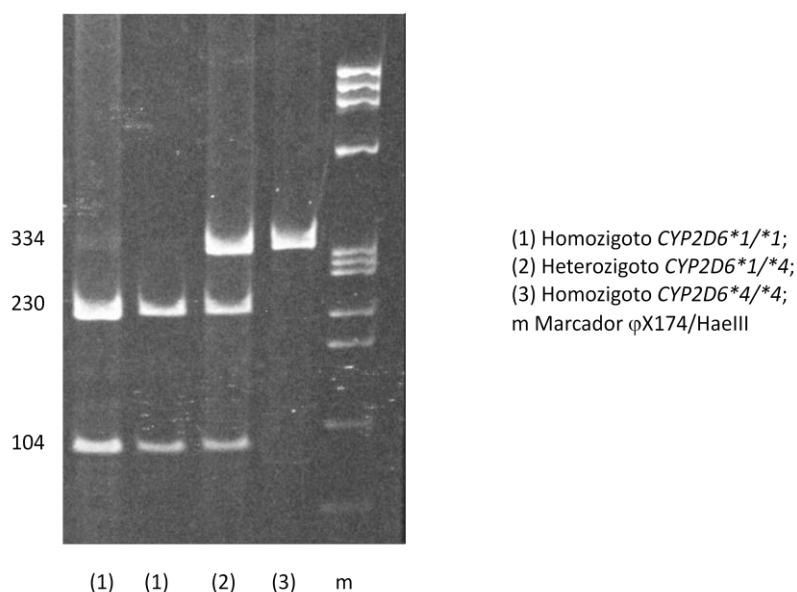


Figura 1. Gene *CYP2D6*

Genes *GSTM1* e *GSTT1*

A presença do gene *GSTM1* foi determinada pela amplificação, por PCR, de um fragmento de 230pb, do mesmo, e posterior electroforese e visualização. Como controlo interno da reacção foi co-amplificado um fragmento de 157pb do gene *GSTM4*. Foram utilizados 50 a 100 ng de ADN num volume de reacção de 25 μ L contendo 200 ng do *primer* (P3) 5'-CGCCATCTGTGCTACATTGCCCG-3', 100 ng do *primer* (P4) 5'-ATCTTCTCCTTCTGTCTC-3', 100 ng do *primer* (P5) 5'-TTCTGGATTGTAGCAGATCA-3', 1U de *Taq* ADN polimerase, 200 μ M de cada dNTP, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0) e 5,0% DMSO. Após uma desnaturação prévia a 94°C durante 5 minutos, realizaram-se 30 ciclos constituídos por desnaturação a 94°C durante 1 minuto, ligação a 52°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto. Os produtos da PCR foram submetidos a uma electroforese em um gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados com luz ultra violeta^{600,601} (figura 2).

A presença do gene *GSTT1* foi detectada pela amplificação, por PCR, de um fragmento de 480pb, pertencente ao mesmo. Como controlo interno da reacção, foi realizada a co-amplificação de um fragmento de 268pb correspondente ao gene da β -globina. Foram utilizados 50 a 100 ng de ADN num volume de reacção de 25 μ L contendo 100 ng do *primer* (P6) 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3', 100 ng do *primer* (P7) 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3', 100 ng do *primer* (P8) 5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3', 100 ng do *primer* (P9) 5'-GAAGAGCCAAGGACAGTTAC-3', 1U de *Taq* ADN polimerase, 200 μ M de cada dNTP, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0) e 5,0% DMSO. Após uma desnaturação prévia a 94°C durante 2,5 minutos, realizaram-se 34 ciclos constituídos por desnaturação a 94°C durante 1 minuto, ligação a 58°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto. Os produtos da PCR foram submetidos a uma electroforese num gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados com luz ultra violeta.

Os *primers* P6 e P7 são específicos para o gene *GSTT1*, amplificando um fragmento de 480pb. A co-amplificação de um fragmento de 268pb do gene da β -globina serviu como controlo interno da reacção (figura 2). A análise do padrão de bandas numa electroforese permitiu apurar os genótipos em causa, e de acordo com os métodos anteriormente publicados.^{601,602} Esta metodologia não permitiu distinguir os genótipos nulos heterozigotos dos *wild-type* homozigotos (figura 2).

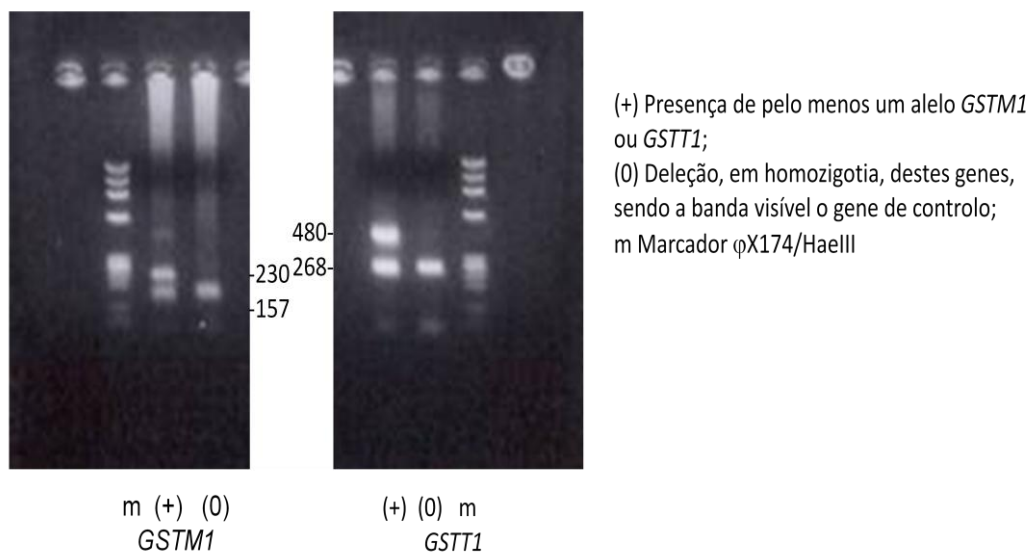


Figura 2. Genes *GSTM1* e *GSTT1*

3.2.3. Análise molecular do gene *AIP*

O estudo do gene *AIP* no ADN obtido de leucócitos de sangue periférico foi efectuado no Laboratório de Patologia Molecular do Serviço de Anatomia Patológica do IPO de Coimbra com a colaboração do Professor Doutor Hugo Prazeres e com a supervisão do Professor Doutor Ashley Grossman e da Professora Doutora Marta Korbonits do St. Bartholomew's Hospital do Reino Unido.

O ADN germinal foi isolado de amostras de sangue periférico de acordo com os protocolos padronizados. As mutações germinais do gene *AIP* foram investigadas pela amplificação por PCR de todos os exões do gene *AIP* (exões 1, 2, 3, 4, 5 e 6) e sequenciação do ADN em conformidade com o protocolo descrito por Vierimaa e co-autores²¹² e adaptado pela Professora Doutora Marta Korbonits e Professor Doutor Ashley Grossman.

3.2.4. Problemas éticos

O estudo foi realizado em doentes já diagnosticados e conhecedores da sua patologia. A inclusão de cada doente no estudo pressupôs o seu consentimento informado. O ADN doado por cada doente ou controlo foi codificado e arquivado em condições de segurança e de anonimato no Serviço de Genética Médica da Faculdade de Medicina da Universidade

de Coimbra e no Instituto Português de Oncologia da Zona Centro. Os resultados do estudo genético foram mantidos confidenciais e acessíveis apenas aos médicos ou outros profissionais participantes ou ao doente ou controlo. Todas as etapas do estudo respeitaram as normas impostas pela Comissão de Ética dos Hospitais da Universidade de Coimbra.

3.3. Estudo estatístico

3.3.1. Estudo clínico

As variáveis contínuas foram analisadas para a sua distribuição e os dados foram expressos em média (\pm desvio padrão) quando paramétricos, e mediana (intervalo) quando não paramétricos. O teste *t* de student e de Mann-Whitney foram usados para comparar variáveis contínuas em dois grupos com distribuição normal e não normal. O teste do qui-quadrado foi usado para comparar variáveis nominais em dois grupos, e o teste de Wilcoxon para comparação de variáveis ordinais emparelhadas. A regressão linear e a correlação de Pearson, o *odds ratio* e o coeficiente de Spearman, para a associação das variáveis quantitativas, nominais e ordinais, respectivamente. A análise de sobrevivência de Kaplan-Meier foi usada para estimar a percentagem cumulativa de sobrevivência livre de doença *versus* progressão ou recorrência do tumor. O teste de *log-rank* foi utilizado para avaliar as diferenças no comportamento dos tumores entre os doentes com progressão ou recorrência *versus* os sem progressão ou recorrência de doença. Para confirmação destes resultados efectuou-se a análise de regressão de Cox (*Cox proportional hazard regression*). A significância estatística foi assumida com um risco de 5% de erro do tipo 1. O estudo estatístico foi realizado usando o *software* do programa comercial de estatística SPSS (versão 18.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

3.3.2. Estudo molecular

As frequências alélicas e genótípicas obtidas na globalidade dos tumores e em cada subgrupo destes foram comparadas com as obtidas no grupo de controlo, recorrendo a métodos estatísticos apropriados, tais como o *odds ratio* e respectivo intervalo de confiança, e o teste do qui-quadrado. O teste de Fisher foi usado quando apropriado. A significância estatística foi considerada com um risco de 5% de erro do tipo 1 e ajustada para o número de comparações usando a correcção de Bonferroni.

IV. RESULTADOS

1. Estudo clínico

1.1. Amostra global

Apresentam-se os dados clínicos basais de todos os doentes com tumores hipofisários clinicamente não funcionantes seguidos no Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC, EPE (tabela 1). No entanto os dados mais detalhados dos diferentes aspectos analisados serão relativos apenas aos macroadenomas uma vez que só nesta amostra é que se verificou progressão ou recorrência do tumor. Este trabalho foi assim direccionado apenas para estes doentes, afinal os que constituíram o objectivo deste trabalho, a maioria, e a que coloca maiores dificuldades de seguimento e de orientação.

Dos doentes com tumores da hipófise clinicamente não funcionantes seguidos no Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos Hospitais da Universidade de Coimbra, desde 1970 até 2009, inclusive, foram seleccionados 236, 130 do sexo feminino e 106 do sexo masculino; alguns foram excluídos por insuficiência de dados ou de caracterização. A média de idades foi de $54,9 \pm 16,1$ anos na amostra global, de $53,8 \pm 16,4$ anos no sexo feminino e de $56,7 \pm 15,6$ anos no sexo masculino, não havendo diferença significativa entre os géneros. A mediana foi de 57,0 (16 a 82), 54,5 (16 a 82) e 60 (17 a 82) anos, respectivamente. Relativamente às suas dimensões: na amostra global, 221 eram macroadenomas e 15 microadenomas; no sexo feminino 118 e 12 e no sexo masculino 103 e 3, respectivamente. Os macroadenomas foram significativamente mais frequentes no sexo masculino ($OR\ 3,49$, $p=0,038$) relativamente ao sexo feminino. O número de diagnósticos foi particularmente mais importante nas últimas duas décadas, tendo sido idêntico em ambos os sexos. O facto de a maioria dos doentes seguidos ter sido diagnosticada sobretudo a partir da década de noventa, inclusive, poder-se-á dever ao facto de desde então ter havido maior disponibilidade dos meios tecnológicos de imagem, à melhor articulação com a Neurocirurgia e a um seguimento mais efectivo em um Serviço de Endocrinologia. No que diz respeito ao diagnóstico e dimensões do tumor não se verificou que o diagnóstico fosse efectuado numa fase significativamente mais precoce. Embora pareça haver uma redução de tendência dos tumores de maior diâmetro diagnosticados nas décadas mais recentes, não se verificou uma redução significativa das referidas dimensões. Refere-se contudo que nos doentes diagnosticados há mais tempo, as dimensões dos tumores nem sempre foram referidas, pelo que também poderá constituir um viés. O seguimento médio foi de $8,1 \pm 6,3$ anos e idêntico em ambos os sexos, $8,0 \pm 6,4$ anos no sexo feminino e $8,2 \pm 6,3$ anos no sexo masculino. Foram perdidos para o seguimento 78 doentes, 43 no sexo feminino e 35 no sexo masculino. Durante o seguimento, nenhum doente com microadenoma faleceu mas 26 doentes (11,8%) com macroadenoma vieram a falecer (tabela 1).

Tabela 1. Tumores da hipófise clinicamente não funcionantes: amostra global

	Total	Sexo F	Sexo M	<i>p</i>
Total (%)	236	130 (55,1)	106 (44,9)	
Idade de diagnóstico (anos)	54,9±16,1	53,5±16,4	56,7±15,6	0,137
Mediana	57,0	54,5	60,0	
Mínima	16	16	17	
Máxima	82	82	82	
Tipo de tumor (%)				0,038^a
Macro	221 (93,6)	118 (90,8)	103 (97,2)	
Micro	15 (6,4)	12 (9,2)	3 (2,8)	
Maior diâmetro tumor (mm) ^b	26,6±11,4	24,7±12,6	28,6±9,5	0,005
Mediana	25,0	21,8	28,0	
Mínimo	3	3	6	
Máximo	60	60	55	
Classificação de Hardy (%) ^c				0,235
Grau I	15 (6,4)	12 (9,6)	3 (3,0)	
Grau II	78 (33,1)	42 (33,6)	36 (35,6)	
Grau III	55 (23,3)	31 (24,8)	24 (23,8)	
Grau IV	78 (33,1)	40 (32,0)	38 (37,6)	
Década de diagnóstico (%)				0,794
1970-1979	3 (1,3)	1 (0,8)	2 (1,9)	
1980-1989	11 (4,7)	6 (4,6)	5 (4,7)	
1990-1999	98 (41,5)	54 (41,5)	44 (41,5)	
2000-2009	124 (52,5)	69 (53,1)	55 (51,9)	
Década de diagnóstico e maior diâmetro do tumor (mm)				0,115
1980-1989	35,8±3,4	—	35,8±3,4	
1990-1999	27,9±11,9	26,7±13,6	29,0±10,0	
2000-2009	25,95±11,1	23,7±12,1	27,8±9,4	
Seguimento				
Duração (anos)	8,1±6,3	8,0±6,4	8,2±6,3	0,862
Perdidos (%)	78 (33,1)	43 (33,1)	35 (33,0)	0,992
Mortalidade (%)	26 (11,8)	16 (13,6)	10 (9,7)	0,375

^aOR (IC 95%): 0,286 (0,079-1,043)

^bSó disponível em 163 doentes; ^cSó disponível em 226 doentes

Década de diagnóstico e classificação de Hardy na amostra global (%)	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV
1970-1979	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
1980-1989	2 (20,0)	1(10,0)	3 (30,0)	4 (40,0)
1990-1999	6 (6,5)	28 (30,4)	23 (25,0)	35 (38,0)
2000-2009	7 (5,7)	49 (40,2)	27 (22,1)	39 (32,0)

1.2. Microadenomas clinicamente não funcionantes

Os microadenomas clinicamente não funcionantes não constituíram objectivo *major* de análise pelo motivo atrás referido bem como pelo seu pequeno número. No entanto apresentam-se alguns aspectos mínimos (tabela 2). Refere-se que a idade de diagnóstico foi significativamente inferior à dos macroadenomas, $34,4 \pm 19,3$ anos vs. $56,3 \pm 14,9$ anos ($p < 0,001$), e que o número de casos diagnosticados antes da década de oitenta foi nulo, por insuficiência dos meios técnicos disponíveis na época; em cada uma das duas últimas décadas o número de diagnósticos foi semelhante. Clinicamente a queixa dominante foram as cefaleias inespecíficas, que motivaram na maioria das situações o estudo neurorradiológico. Nenhum doente apresentou clínica neuro-oftalmológica, défices ou hiperprodução hormonais. Realça-se o facto de nenhum dos casos ter evoluído para macroadenoma, ou seja, não houve progressão significativa da doença neste tipo de adenomas, após um seguimento médio de 6,6 anos (1 a 15 anos). Todos se mantiveram com dimensões inferiores a 10 mm e sem grande variação do seu maior diâmetro. Os doentes perdidos para o seguimento deveram-se a abandonos, ou a alta da consulta pela estabilidade e ausência de repercussões do tumor.

Tabela 2. *Microadenomas da hipófise clinicamente não funcionantes*

Total (n)	15
Género (%)	
Feminino	12 (80,0)
Masculino	3 (20,0)
Idade de diagnóstico (anos)	$34,4 \pm 19,3$
Década de diagnóstico (%)	
1970-1979	0 (0)
1980-1989	2 (13,3)
1990-1999	6 (40,0)
2000-2009	7 (46,7)
Maior diâmetro do tumor (mm)	$6,2 \pm 2,4$
Duração do seguimento (anos)	$6,6 \pm 4,5$
Perdidos para o seguimento (%)	10 (66,6)

1.3. Macroadenomas clinicamente não funcionantes

Os tumores clinicamente não funcionantes com dimensões superiores a 10 mm (macroadenomas) foram o objectivo do estudo clínico e sobre os quais a análise incidiu. Foram estudados 221 doentes. Apresentam-se as suas características clínicas e epidemiológicas gerais, o estudo endocrinológico e oftalmológico antes e após tratamento, as características dos tumores, tipo de tratamento e situação actual, correspondente ao final do ano de 2009. Após a definição do seu estado, sem ou com progressão ou recorrência do tumor, procedeu-se à análise dos factores clínicos

potencialmente envolvidos e preditivos desse comportamento biológico, mais agressivo ou menos indolente.

População estudada: diagnóstico e seguimento

As características gerais do diagnóstico e seguimento da população estudada são apresentadas na tabela 3. Foram estudados 118 (53,4%) doentes do sexo feminino e 103 (46,6%) do sexo masculino (razão 10,5:9). A idade média de diagnóstico foi de 56,3 anos (22 a 82 anos), idêntica em ambos os géneros. Aproximadamente 35% dos doentes foram diagnosticados com uma idade igual ou superior a 65 anos tendo sido semelhante em ambos os sexos. A grande maioria dos doentes seguidos foi diagnosticada nas duas últimas décadas. Parece haver uma tendência a um maior número de diagnósticos na última década de 2000 a 2009, não tendo contudo atingido o limiar da significância estatística. Por outro lado também não se observou uma redução significativa do maior diâmetro do tumor nessas duas décadas, o que poderá estar em concordância com o facto de serem tumores clinicamente não funcionantes. O seguimento médio foi de 8,2 anos (1 a 40 anos), idêntico em ambos os sexos. Em dez doentes não houve seguimento devido a morte no pós-operatório, abandono ou pedido de alta da consulta para outros centros aquando da primeira consulta. Na totalidade foram perdidos para o seguimento 68 (30,8%) doentes, 36 (30,5%) do sexo feminino e 32 (31,1%) do sexo masculino. A morte ocorreu em 26 (11,8%), sendo 16 (13,6%) do sexo feminino e 10 (9,7%) do sexo masculino. As causas de morte foram: complicações no pós-operatório imediato; neoplasias malignas associadas e causas indeterminadas. Nestes doentes falecidos, a idade média da morte foi de 72 anos (50 a 84 anos), 70,7 anos (50 a 82 anos) no sexo feminino e 74,4 anos (56 a 84 anos) no sexo masculino.

Tabela 3. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: diagnóstico e seguimento*

	Total	Sexo F	Sexo M	<i>p</i>
Total (%)	221	118 (53,4)	103 (46,6)	
Idade de diagnóstico (anos)	56,3±14,9	55,5±14,8	57,2±15,0	0,415
<65 anos (%)	143 (64,7)	81 (68,6)	62 (60,2)	0,190
≥65 anos (%)	78 (35,3)	37 (31,4)	41 (39,8)	
Década de diagnóstico (%)				0,756
1970-1979	3 (1,4)	1 (0,85)	2 (1,9)	
1980-1989	9 (4,1)	4 (3,4)	5 (4,9)	
1990-1999	92 (41,6)	50 (42,4)	42 (40,8)	
2000-2009	117 (52,9)	63 (53,4)	54 (52,4)	
Década de diagnóstico e maior diâmetro do tumor (mm)				0,181
1980-1989	35,8±3,4	—	35,8±3,4	
1990-1999	29,1±11,0	28,3±12,8	29,9±9,0	
2000-2009	26,8±10,3	25,4±11,2	28,3±9,0	
Duração do seguimento (anos) ^a	8,2±6,5	8,1±6,5	8,3±6,42	0,891
Perdidos para o seguimento (%)				0,928
Total	68 (30,8)	36 (30,5)	32 (31,1)	
Abandono	40 (18,1)	18 (15,3)	22 (21,4)	
Alta a pedido	2 (0,9)	2 (1,7)	0 (0)	
Morte	26 (11,8)	16 (13,6)	10 (9,7)	
Morte				
Total (%)	26 (11,8)	16 (13,6)	10 (9,7)	0,375
Idade (anos)	72,0±9,5	70,7±10,2	74,4±8,3	0,387

^aEm 10 doentes não houve seguimento pelo que foram excluídos

Apresentação clínica

A apresentação clínica global e por géneros é apresentada na tabela 4. O diagnóstico dos tumores foi efectuado, em média, cerca de dois anos (26,3 meses) após o início da sintomatologia. A duração média dos sintomas foi superior no sexo feminino, 29,2 meses (0 a 180 meses) *versus* 22,9 meses (0 a 240 meses), embora a diferença não tenha sido significativa. A sintomatologia dominante foi a resultante do efeito de massa. Os sintomas neurológicos ocorreram em 79,2% dos doentes (82,2% no sexo feminino e 75,7% no sexo masculino) tendo sido as cefaleias o único sintoma significativamente mais frequente no sexo feminino (66,1% *vs.* 47,6%, $p=0,005$). Os sintomas neuro-oftalmológicos estiveram presentes em cerca de dois terços (60,2%) dos doentes com uma maior prevalência no sexo masculino (67,0% *vs.* 54,2%, $p=0,053$): os défices visuais (de acuidade visual e campimétricos) foram significativamente mais frequentes no sexo masculino (64,1% *vs.* 50,8%, $p=0,047$) o mesmo não tendo acontecido com as parésias dos pares cranianos (8,7% *vs.* 5,9%, $p=0,422$). Os sintomas endocrinológicos ocorreram em quase cinquenta por cento dos doentes (48,4%), e de forma idêntica no género feminino e masculino, embora este último tenha apresentado uma percentagem ligeiramente superior dos diversos sintomas. Os compatíveis com insuficiência gonadal foram os mais evidentes tendo surgido em cerca de um terço dos doentes (34,4%). Em 24 (10,9%) dos doentes

registou-se apoplexia/hemorragia do tumor, tendo sido clínica (diagnóstico por cefaleia súbita e severa, perda de visão, oftalmoplegia, alterações da consciência e hipopituitarismo), em 4,1% e sub-clínica (diagnóstico particularmente na TC ou RM, na cirurgia ou na neuropatologia) em 6,8%. Apesar de não se terem registado diferenças significativas entre os géneros poder-se-á realçar que esta forma de apresentação foi mais frequente no sexo feminino, sobretudo devido à maior frequência da forma sub-clínica, e que no sexo masculino a forma mais evidente foi a clínica, a verdadeira apoplexia hipofisária. Em 32 (14,5%) dos doentes o diagnóstico foi efectuado de forma incidental: após traumatismos crânio-encefálicos em 5 (2,3%); por acidentes vasculares cerebrais em 13 (5,9%); após lipotímia ou síncope em 5 (2,3%); suspeita de patologia dos seios da face em 4 (1,8%); hipoacusia em 2 (0,9%); no quadro de doença psiquiátrica em 1 (0,5%) e na determinação do estágio de tumores malignos em 2 (0,9%). Apesar de esta forma de apresentação ter sido mais frequente no sexo masculino (18,4% vs. 11,0%), não o foi de forma significativa.

Observou-se a presença de uma neoplasia associada a estes tumores em 28 (12,7%) dos doentes, idêntica em ambos os géneros (11,9% vs. 13,6%). Os tumores associados foram: 5 carcinomas da mama; 9 doenças linfoproliferativas; 2 carcinomas do cólon; 2 carcinomas epidermóides do pénis; 2 carcinomas gástricos; 2 carcinomas da bexiga; 1 carcinoma do pulmão; 1 basalioma; 1 carcinoma do pâncreas; 1 carcinoma do endométrio; 1 glioma do nervo óptico e 1 meningioma. Um doente associava mais do que um tumor.

Tabela 4. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: apresentação clínica*

	Total	Sexo F	Sexo M	p
Duração dos sintomas (meses)	26,3±37,3	29,2±37,0	22,9±36,5	0,288
Sintomas neurológicos (%)				
Total	175 (79,2)	97 (82,2)	78 (75,7)	0,237
Cefaleias	127 (57,5)	78 (66,1)	49 (47,6)	0,005
Desequilíbrio, tonturas	56 (25,3)	34 (28,8)	22 (21,4)	0,204
Náuseas, vômitos	20 (9,0)	14 (11,9)	6 (5,8)	0,119
Lipotímia	9 (4,1)	3 (2,5)	6 (5,8)	0,218
Acidente vascular cerebral	11 (5,0)	4 (3,4)	7 (6,8)	0,245
Outros	18 (8,1)	7 (5,9)	11 (10,7)	—
Sintomas neuro-oftalmológicos (%)				
Total	133 (60,2)	64 (54,2)	69 (67,0)	0,053
Défice visual	126 (57,0)	60 (50,8)	66 (64,1)	0,047
Parésias pares cranianos	16 (7,2)	7 (5,9)	9 (8,7)	0,422
Sintomas endocrinológicos (%)				
Total	107 (48,4)	56 (47,5)	51 (49,5)	0,760
Insuficiência gonadal	77 (34,4)	37 (31,4)	40 (38,8)	0,244
Insuficiência tiroideia	39 (17,6)	18 (15,3)	21 (20,4)	0,318
Insuficiência adrenal	11 (5,0)	6 (5,1)	5 (4,9)	0,937
Poliúria e polidipsia	4 (1,8)	2 (1,7)	2 (1,9)	0,891
Apoplexia/hemorragia (%)	24 (10,9)	11 (9,3)	13 (12,6)	0,432
Sub-clínica	15 (6,8)	9 (7,6)	6 (5,8)	0,072
Clínica	9 (4,1)	2 (1,7)	7 (6,8)	
Incidentaloma (%)	32 (14,5)	13 (11,0)	19 (18,4)	0,117
Outros tumores associados (%)	28 (12,7)	14 (11,9)	14 (13,6)	0,700

Características dos tumores

As características dos tumores neurorradiológicas, cirúrgicas e neuropatológicas estão sintetizadas na tabela 5. O volume do tumor não foi possível de avaliar tendo-se apenas considerado o seu maior diâmetro, podendo ser longitudinal, transverso ou antero-posterior, uma vez que nem sempre todos os diâmetros foram mencionados ou passíveis de recuperação, particularmente nos casos mais antigos, de acordo com o já referido. Assim sendo, a dimensão média dos tumores, avaliada pelo maior diâmetro foi de 27,8 mm (11 a 60 mm). Observou-se que os tumores tinham um maior diâmetro médio significativamente superior no sexo masculino relativamente ao do sexo feminino, 29,1 mm vs. 26,4 mm, $p=0,019$. Como todos eram macroadenomas todos tinham, pelo menos, um grau II na classificação de Hardy. A distribuição dos tumores pelos graus de Hardy não evidenciou diferenças significativas entre os dois géneros. Foi observada uma correlação positiva entre o maior diâmetro do tumor e o grau de Hardy ($r=0,61$, $p<0,001$).

Relativamente à extensão extra-selar verificou-se que 95,4% dos tumores tinham extensão supra-selar, 46,5% infra-selar e 37,3% para-selar. Apenas a extensão supra-selar se mostrou significativamente mais frequente no sexo masculino (99,0% vs. 92,2%, OR 8,4, $p=0,018$). A invasão do seio cavernoso esteve presente em 19% dos tumores, do pavimento/óssea (correspondente a invasão óssea definida pela presença de erosão do pavimento em exames de imagem ou identificada no estudo histológico) em 44,3%, do

seio esfenoidal em 22,2% e do seio cavernoso e pavimento em 8,1%. O sexo masculino apresentou uma percentagem de invasão de todas estas estruturas superior ao sexo feminino mas essa diferença, contudo, não se mostrou significativa.

Outras características dos tumores registadas foram: a presença de áreas quísticas e de necrose em 11,3% e de hemorragia/apoplexia em 10,9%.

Os cortes histológicos foram estudados por imunohistoquímica para as gonadotrofinas, subunidade- α , prolactina, somatotrofina, corticotrofina e tirotofina. Quando não foi efectuada esta avaliação os tumores foram designados de clinicamente não funcionantes. A maioria (44,8%) não foi positiva para nenhuma das hormonas testadas motivo pelo qual foram designados de tumores não secretores. Os gonadotrofinomas ocorreram em 27,9%, os corticotrofinomas em 5,5%, os tirotrofinomas em 3,5%, os plurihormonais em 2,5% e apenas um caso de somatotrofinoma e outro de prolactinoma, silenciosos. A percentagem de tumores não secretores, gonadotrofinomas e corticotrofinomas silenciosos foi idêntica em ambos os géneros. Os outros tipos foram um pequeno número pelo que não foi efectuada a análise relativa à distribuição por sexos. O estudo do indicador de proliferação celular Ki-67 expresso pelo anticorpo MIB-1 só foi realizado em 53 doentes e de forma semi-quantitativa. A expressão da proteína p53 só foi analisada nos tumores atípicos ou em casos de maior suspeição. O facto de só um pequeno número de doentes ter sido estudado relativamente a esta variável deveu-se à escassez de recursos humanos e técnicos. Nesta pequena amostra foram encontrados três (5,6%) adenomas atípicos, um no sexo feminino (3,6%) e dois no sexo masculino (8,0%).

Tabela 5. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: características dos tumores*

	Total	Sexo F	Sexo M	p
Dimensões ^a (mm)				0,019
Diâmetro maior	27,8±10,5	26,4±11,7	29,1±9,0	
Mediana	26,0	23,3	26,5	
Diâmetro mínimo	11	11	14,8	
Diâmetro máximo	60	60	55	
Classificação de Hardy ^b (%)				0,844
Grau II	78 (37,0)	42 (37,2)	36 (36,7)	
Grau III	55 (26,1)	31 (27,4)	24 (24,5)	
Grau IV	78 (37,0)	40 (35,4)	38 (38,8)	
Extensão extra-selar (%)				0,018^e
Supra-selar	207 (95,4)	107 (92,2)	100 (99,0)	0,998
Infra-selar	101 (46,5)	54 (46,6)	47 (46,5)	0,136
Para-selar	81 (37,3)	38 (32,8)	43 (42,6)	
Invasão (%)				
Seio cavernoso	42 (19,0)	21 (17,8)	21 (20,4)	0,624
Pavimento/óssea	98 (44,3)	48 (40,7)	50 (48,5)	0,427
Seio esfenoidal	49 (22,2)	20 (16,9)	29 (28,2)	0,045
Seio cavernoso e pavimento	18 (8,1)	8 (6,8)	10 (9,7)	0,427
Aspectos do tumor (%)				
Áreas quísticas e necrose	25 (11,3)	11 (9,3)	14 (13,6)	0,317
Hemorragia/apoplexia	24 (10,9)	11 (9,3)	13 (12,6)	0,432
Imunohistoquímica ^c (%)				
Não secretor	90 (44,8)	47 (44,8)	43 (44,8)	0,997
FSH/LH/SUα-positivo	56 (27,9)	28 (26,7)	28 (29,2)	0,693
ACTH-positivo	11 (5,5)	8 (7,6)	3 (3,1)	0,162
TSH-positivo	7 (3,5)	1 (1,0)	6 (6,3)	—
Prolactina-positivo	1 (0,5)	1 (1,0)	0 (0)	—
GH-positivo	1 (0,5)	1 (1,0)	0 (0)	—
Plurihormonal	5 (2,5)	3 (2,9)	2 (2,1)	—
Não funcionante	30 (14,9)	16 (15,2)	14 (14,6)	—
Adenoma atípico ^d (%)	3 (5,6)	1 (3,6)	2 (8,0)	—

^aSó disponível em 154 doentes; ^bSó disponível em 211 doentes; ^cSó disponível em 201 doentes;

^dMIB-1/Ki-67 só disponível em 53 doentes (28 femininos e 25 masculinos); ^eOR 8,41 (1,047-67,59)

Avaliação pré e pós-operatórias: função hipofisária e estudo oftalmológico

Os estudos da função hipofisária e oftalmológico prévios às intervenções terapêuticas encontram-se descritos na tabela 6. O estudo endocrinológico revelou deficiência do sector da somatotrofina em 86,6% dos doentes, gonadal em 70,4%, tiroideu em 37,3% e cortico supra-renal em 25%. A média da prolactina foi de 24,1 ng/mL (0 a 153 ng/mL), havendo hiperprolactinemia (prolactina superior a 20 ng/mL) em 40,2% dos casos. A IGF1 encontrou-se inferior ao limite inferior do normal em 39,6% dos doentes. Todos os défices da função ante-hipofisária foram significativamente superiores no sexo masculino. A hiperprolactinemia e a prolactinemia média foram significativamente maiores no sexo feminino, tendo-se verificado uma correlação positiva entre os níveis de prolactina e o

maior diâmetro do tumor em ambos os géneros ($r=0,245$, $p=0,039$ no sexo feminino e $r=0,249$, $p=0,041$ no sexo masculino). A diabetes insípida ocorreu em dois casos.

O estudo oftalmológico evidenciou défice visual (acuidade visual ou campos visuais) em 73,5% dos doentes, sendo acentuado em 67,9% e parcial em 5,6%. O défice visual foi igualmente superior de forma significativa no sexo masculino. As parésias dos pares cranianos ocorreram em 7,2% dos doentes.

Tabela 6. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: estudo endocrinológico e oftalmológico pré tratamento*

	n ^a	Total	Sexo F	Sexo M	p
Deficiências hipofisárias (%)					
GH	82	71 (86,6)	27 (75)	44 (95,7)	0,006
FSH/LH	189	133 (70,4)	66 (62,9)	67 (79,7)	0,011
TSH	185	69 (37,3)	30 (28,6)	39 (48,8)	0,005
ACTH	180	45 (25,0)	17 (16,8)	28 (35,4)	0,004
Prolactina (ng/mL)	189				<0,001
Média		24,1±23,7	33,1±27,9	13,6±10,4	
Mediana		17,0	24,3	11,0	
Mínima		0	4,2	0	
Máxima		153	153	50	
Hiperprolactinemia ^b (%)	189	76 (40,2)	61 (59,8)	15 (17,2)	<0,001
Défice IGF1 (%)	134	53 (39,6)	19 (27,1)	34 (53,1)	0,002
Diabetes insípida (%)	213	2 (0,9)	1 (0,9)	1 (1,0)	0,900
Défice visual (%)	196	144 (73,5)	72 (67,3)	72 (79,9)	0,029
Défice acentuado		133 (67,9)	69 (64,5)	64 (71,9)	
Défice parcial		11 (5,6)	3 (2,8)	8 (9,0)	
Parésias (%)		16 (7,2)	7 (5,9)	9 (8,7)	0,422

^aNúmero de doentes com estudo pré tratamento; ^bValor superior a 20 ng/mL

O estudo da função hipofisária e o oftalmológico após tratamento encontram-se descritos na tabela 7. Após a cirurgia, e em alguns casos da radioterapia, verificou-se a manutenção de défices importantes da função ante-hipofisária com redução da prolactinemia média e da hiperprolactinemia. Observou-se défice do sector da somatotrofina em 89,2% dos doentes, gonadal em 73,6%, tiroideu em 48,4% e cortico supra-renal em 37%. A média de prolactina foi de 10,7 ng/mL (0 a 53 ng/mL) e a hiperprolactinemia ocorreu em 11,4% dos casos. A IGF1 encontrou-se inferior ao limite inferior do normal em 50,3% dos doentes. A insuficiência ante-hipofisária global ocorreu em cerca de um terço (31,6%) dos doentes. Analisando as diferenças entre os géneros verifica-se que só os défices do sector da somatotrofina, gonadal e da IGF1 se mantiveram significativamente superiores no sexo masculino. A média da prolactina e a hiperprolactinemia foram significativamente superiores no sexo feminino. No entanto só se verificou uma correlação positiva entre os níveis de prolactina e maior diâmetro do tumor no sexo masculino ($r=0,606$, $p<0,001$). A diabetes insípida foi de 14,3%, transitória em 7,1% e permanente em 7,1%, sendo idêntica em ambos os sexos. O défice visual foi menor, de 51,1% na globalidade dos doentes, com

maior gravidade em 22% e parcial em 29%. Verificou-se uma recuperação total ou quase total das parésias dos pares cranianos.

Tabela 7. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: estudo endocrinológico e oftalmológico após tratamento*

	n ^a	Total	Sexo F	Sexo M	p
Deficiências hipofisárias (%)					
GH	93	83 (89,2)	37 (82,2)	46 (95,8)	0,034
FSH/LH	193	142 (73,6)	67 (65,7)	75 (82,4)	0,009
TSH	190	92 (48,4)	43 (42,6)	49 (55,1)	0,086
ACTH	192	71 (37,0)	34 (33,7)	37 (40,7)	0,316
Prolactina (ng/mL)	185				<0,001
Média		10,7±9,0	13,6±10,4	7,53±5,7	
Mediana		8,2	11,0	6,1	
Mínima		0	0,4	0	
Máxima		52	52	35	
Hiperprolactinemia ^b (%)	185	21 (11,4)	18 (18,4)	3 (3,4)	0,001
Défice IGF1 (%)	169	85 (50,3)	38 (42,2)	47 (59,5)	0,025
Panhipopituitarismo (%)	193	61 (31,6)	30 (29,4)	31 (34,1)	0,488
Diabetes insípida (%)	196	28 (14,3)	18 (17,6)	10 (10,6)	0,282
Transitória		14 (7,1)	10 (9,8)	4 (4,3)	
Permanente		14 (7,1)	8 (7,8)	6 (6,4)	
Défice visual (%)	186	95 (51,1)	98 (49,0)	88 (53,4)	0,798
Défice acentuado		41 (22,0)	20 (20,4)	21 (23,9)	
Défice parcial		54 (29,0)	28 (28,6)	26 (29,5)	

^aNúmero de doentes com estudo após tratamento; ^bValor superior a 20 ng/mL

O estudo hormonal apenas nos doentes que têm ambas as avaliações, antes e após tratamento, está sintetizado na tabela 8. Assim sendo e quando analisadas as diferentes variáveis da função hipofisária verificou-se que houve uma elevada percentagem (superior a oitenta por cento) de insuficiência dos sectores da somatotrofina e gonadal, na amostra global e em ambos os géneros e sem melhoria significativa após a cirurgia ou a radioterapia. A insuficiência do sector tiroideu observou-se em aproximadamente cinquenta por cento dos doentes do sexo masculino não havendo modificação com o tratamento. No sexo feminino registou-se um agravamento significativo da insuficiência tiroideia após o tratamento (30,7% vs. 42%, $p=0,033$). A insuficiência cortico supra-renal ocorreu em cerca de um terço dos doentes do sexo masculino e não sofreu alterações relevantes com o tratamento. No sexo feminino houve um agravamento significativo desta insuficiência (17,9% vs. 36,9%, $p<0,001$) que se reflectiu na amostra global (25,6% vs. 36,8%, $p=0,004$). O valor inferior ao limite inferior da normalidade para a IGF1 ocorreu em mais de cinquenta por cento dos casos do sexo masculino que se manteve antes e após o tratamento. No sexo feminino houve um aumento significativo após o tratamento (29,1% vs. 43,6%, $p=0,046$). Quer a prolactinemia média, quer a hiperprolactinemia foram significativamente superiores antes do tratamento, na amostra global e em ambos os géneros.

Tabela 8. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: estudo endocrinológico antes e após tratamento nos doentes com ambas as avaliações*

Défice	n (F/M)	Total			Sexo F			Sexo M		
		Pré (%)	Pós (%)	p	Pré (%)	Pós (%)	p	Pré (%)	Pós (%)	p
GH	54 23/31	92,6	88,9	0,317	87,0	82,6	0,564	96,8	93,5	0,317
FSH/LH	161 89/72	71,4	72,0	0,847	66,3	67,4	0,796	77,8	77,8	1,000
TSH	157 88/69	38,5	45,2	0,114	30,7	42,0	0,033	49,3	49,3	1,000
ACTH	152 84/68	25,6	36,8	0,004	17,9	36,9	<0,001	35,3	36,8	0,796
IGF1	104 55/49	42,3	48,1	0,239	29,1	43,6	0,046	57,1	53,1	0,527
PRL (ng/mL)	155 83/72	25,9± 25,4	9,8± 7,3	<0,001	36,1± 24,7	12,0± 8,3	<0,001	14,2± 10,9	7,2± 4,8	<0,001
PRL >20 ng/mL	155 83/72	43,2	8,4	<0,001	65,1	13,3	<0,001	18,1	2,8	0,002

A análise do estudo oftalmológico antes e após o tratamento está resumida na tabela 9 e evidencia uma melhoria acentuada e significativa dos défices de visão quer na amostra global quer em ambos os géneros.

Tabela 9. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: estudo oftalmológico antes e após tratamento nos doentes com ambas as avaliações*

Visão	Total (n=171)			Sexo F (n=90)			Sexo M (n=81)		
	Pré (%)	Pós (%)	p	Pré (%)	Pós (%)	p	Pré (%)	Pós (%)	p
Défice acentuado	70,1	22,2	<0,001	68,9	21,1	<0,001	71,6	23,5	<0,001
Défice parcial	6,4	29,8		3,3	28,9		9,9	30,9	
Normal	23,4	48,0		27,8	50		18,5	45,7	

Tratamento cirúrgico: tipo, resultados e complicações

Os resultados do tratamento cirúrgico estão resumidos na tabela 10. Dos 221 doentes só 200 foram submetidos a cirurgia hipofisária. Os 21 doentes não foram operados por diversos motivos, nomeadamente: idade avançada; presença de co-morbilidades associadas; recusa pelo doente; opção por vigilância. Em média cada doente teve 1,4 cirurgias (uma a seis cirurgias), sendo que cerca de dois terços (71%) foram operados uma vez e um terço (29%) teve duas ou mais cirurgias, o que foi semelhante para ambos os géneros. No entanto, entre estes, o número de doentes com mais de duas cirurgias foi

significativamente superior no sexo masculino (11,8% vs. 4,2%, $p=0,046$). A maioria das cirurgias foi por via transesfenoidal (84,8%) não tendo havido diferença significativa em ambos os géneros, apesar de nos doentes do sexo masculino a percentagem de cirurgias transcranianas ter sido superior (19,1% vs. 11,4%). A remoção do tumor após a primeira cirurgia foi aparentemente total em 73,5% dos doentes e parcial em 26,5%, tendo sido semelhante nos dois géneros. O tempo decorrido entre a primeira e a segunda cirurgia foi de 4,3 anos (2 meses a 23 anos). Apesar de não ter havido diferença significativa entre os géneros, as mulheres tiveram, em média, um maior intervalo de tempo para uma nova intervenção do que os homens (5,0 anos vs. 3,7 anos). As complicações cirúrgicas registadas ocorreram em 25,5% dos doentes, severas 11,0% e menores 19,5%. O sexo feminino teve, percentualmente, um maior número de complicações, severas e menores. Finalmente realça-se que 7 doentes (3,5%) vieram a falecer no pós-operatório imediato por complicações severas como a hemorragia, pneumatoencéfalo, hidrocefalia, meningite e empiema.

Tabela 10. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: tratamento cirúrgico*

	Total	Sexo F	Sexo M	p
Doentes operados (%)	200 (90,5)	105 (89,0)	95 (92,2)	
Número de cirurgias				
Média	1,4±0,7	1,3±0,6	1,5±0,9	0,292
1 (%)	142 (71,0)	77 (73,3)	65 (68,4)	0,340
>1 (%)	58 (29,0)	28(26,7)	30 (31,6)	0,445
>2 (%)	17 (8,5)	5 (4,2)	12 (11,8)	0,046
Tipo de cirurgia (%)				
Transesfenoidal	190 (84,8)	101 (88,6)	89 (80,9)	0,427
Transcraniana	34 (15,2)	13 (11,4)	21 (19,1)	0,342
Tipo de remoção 1ª cirurgia ^a (%)				0,950
Parcial	50 (26,5)	26 (26,3)	24 (26,7)	
Macroscópica total	139 (73,5)	73 (73,7)	66 (73,3)	
Tempo entre 1ª e 2ª cirurgia (meses)				0,326
Média	52,1±61,8	60,4±68,1	44,3±55,2	
Mediana	31,5	36,0	23,5	
Mínimo	2	2	2	
Máximo	276	264	276	
Complicações (%)				
Total de doentes	51 (25,5)	31 (29,5)	20 (21,1)	
Morte no pós-operatório	7 (3,5)	4 (3,8)	3 (3,2)	
Severas	22 (11,0)	14 (13,3)	8 (8,4)	
Hemorragia	9 (4,5)	5 (4,8)	4 (4,2)	
Hidrocefalia	5 (2,5)	3 (2,9)	2 (2,1)	
Pneumoencéfalo	2 (1,0)	2 (1,9)	0 (0)	
Empiema/meningite	2 (1,0)	2 (1,9)	0 (0)	
Convulsões/epilepsia	2 (1,5)	1 (1,0)	1 (1,1)	
AVC/AIT	1 (0,5)	0 (0)	1 (1,1)	
Déf. visão permanente	1 (0,5)	1 (1,0)	0 (0)	
Menores	39 (19,5)	24 (22,9)	15 (15,8)	
Déf. visão transitório	1 (0,5)	1 (1,0)	0 (0)	
Parésias transitórias	3 (1,5)	1 (1,0)	2 (2,1)	
Rinorráquis	5 (2,5)	3 (2,9)	2 (2,1)	
D. hidroelectrolíticos	1 (0,5)	1 (1,0)	0 (0)	
Anósmia	1 (0,5)	0 (0)	1 (1,1)	
D. insípida transitória	14 (7,1)	10 (9,8)	4 (4,3)	
D. insípida permanente	14 (7,1)	8 (7,8)	6 (6,4)	

^aDesconhecida em 11 doentes

Radioterapia e complicações

Os resultados da radioterapia são apresentados na tabela 11. A radioterapia não constituiu em nenhum caso tratamento de primeira linha tendo sido só instituída após a cirurgia, quer como tratamento coadjuvante da primeira cirurgia, independentemente de o doente ter tido uma cirurgia com remoção aparentemente total ou sub-total, quer como uma segunda terapêutica e complementar às subseqüentes cirurgias. Foram irradiados 23 doentes (10,4%), 11 do sexo feminino e 12 do sexo masculino. A dose total média foi de

48,8 Gy (45 a 54 Gy). O tempo médio decorrido entre a cirurgia e a radioterapia foi de 18,9 meses (1 a 84 meses), não havendo diferença significativa para ambos os géneros. Contudo observou-se uma diferença significativa relativamente ao número de abordagens cirúrgicas prévias à instituição da radioterapia. No sexo feminino a radioterapia foi instituída após a primeira cirurgia em 72,7% dos casos e da segunda em 27,3%; no sexo masculino esta foi instituída em 50% dos casos após a primeira e segunda cirurgias e nos restantes 50% após a terceira a quinta cirurgias. Aproximadamente cinquenta por cento dos doentes tiveram efeitos adversos que estão descritos na tabela 11. Salienta-se o hipopituitarismo em 52,4%, referência a perda de memória em 30,4%, a hipoacusia em 17,4%, a astenia em 17,4% e aparecimento de meningiomas em 8,7%.

Tabela 11. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: radioterapia*

	Total	Sexo F	Sexo M	p
Doentes irradiados (%)	23 (10,4)	11 (9,3)	12 (11,7)	0,572
Tempo de cirurgia a radioterapia (meses)				0,927
Média	18,9±23,3	19,4±23,3	18,4±24,6	
Mediana	10,5	9,5	11,0	
Mínimo	1	3	1	
Máximo	84	80	84	
Radioterapia pós cirurgia (%)				0,011
Primeira	11 (47,8)	8 (72,7)	3 (25,0)	
Segunda	6 (26,1)	3 (27,3)	3 (25,0)	
Terceira	4 (17,4)	0 (0)	4 (33,3)	
Quinta	2 (8,7)	0 (0)	2 (16,7)	
Efeitos adversos (%)				
Total de doentes	12 (52,2)	5 (45,5)	7 (58,3)	
Hipopituitarismo (n=21)	11 (52,4)	6 (54,5)	5 (50,0)	
Leucodistrofia isquémica	1 (4,3)	0 (0)	1 (8,3)	
Hipoacusia	4 (17,4)	0 (0)	4 (33,3)	
Défice de visão transitório	1 (4,3)	0 (0)	1 (8,3)	
Astenia	4 (17,4)	2 (18,2)	2 (16,6)	
Perda de memória	7 (30,4)	3 (27,3)	4 (33,3)	
Labilidade emocional	2 (8,7)	1 (9,1)	1 (8,3)	
Meningioma	2 (8,7)	1 (9,1)	1 (8,3)	

1.4. Macroadenomas clinicamente não funcionantes: progressão ou recorrência e factores preditivos

A avaliação da progressão ou recorrência dos tumores e dos possíveis factores clínicos envolvidos no seu comportamento biológico, constituiu um objectivo determinante neste trabalho. Os critérios para a sua definição já foram anteriormente explicitados. Só foi possível efectuar-la em 194 doentes, 103 do sexo feminino e 91 do sexo masculino. Os restantes não foram considerados, ou por não terem sido operados ou irradiados ou por não terem avaliação após a primeira intervenção cirúrgica hipofisária (tabela 12).

Tabela 12. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: progressão ou recorrência*

	Total	Sexo F	Sexo M	<i>p</i>
Não operado e não irradiado (%)	21 (9,5)	13 (12,0)	8 (7,8)	—
Sem avaliação (%)	6 (2,7)	2 (1,9)	4 (3,8)	—
Progressão ou recorrência (%)				0,110
Sem progressão ou recorrência	114 (51,6)	66 (61,1)	48 (46,6)	
Com progressão ou recorrência	80 (36,2)	37 (34,3)	43 (41,7)	

População estudada: diagnóstico e seguimento

Os aspectos gerais do diagnóstico e seguimento dos doentes em análise encontram-se resumidos na tabela 13. Dos 194 doentes considerados verificou-se que 41,2% tiveram progressão ou recorrência do tumor após um seguimento médio de 8,7 anos (1 a 40 anos). A taxa de recorrência foi superior no sexo masculino mas não de forma significativa, 47,3% vs. 35,9%, $p=0,110$. A análise nas curvas de Kaplan-Meier também não evidenciou diferença significativa de progressão ou recorrência para o género, embora o sexo masculino mostrasse uma tendência para maior progressão dos tumores ($p=0,085$, teste log-rank). A idade de diagnóstico foi semelhante em ambos os grupos ($55,9\pm 14,1$ anos vs. $54,8\pm 14,1$ anos, $p=0,529$). Ao analisar a idade do diagnóstico superior ou igual a 65 anos versus inferior a 65 anos verificou-se uma associação significativa com a probabilidade de progressão ou recorrência para os doentes mais idosos ($p=0,024$, teste log-rank; figura 1).

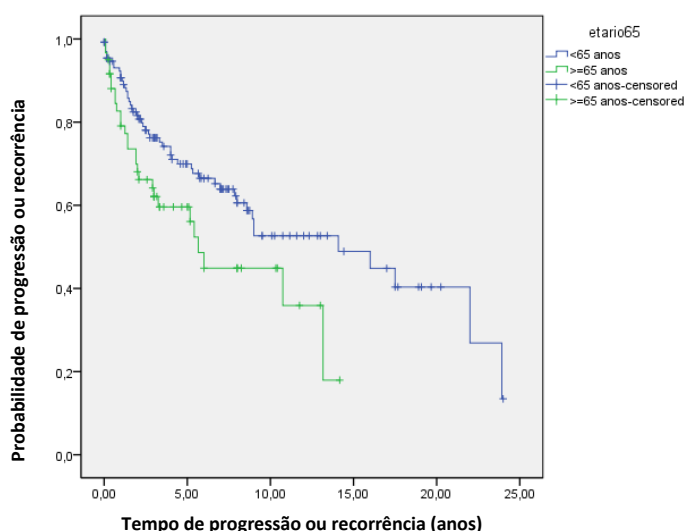


Figura 1. Curvas de Kaplan-Meier para a idade de diagnóstico ≥ 65 anos na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,024$, teste log-rank).

A duração média do seguimento foi significativamente superior no grupo em que se verificou progressão ou recorrência do tumor e de forma significativa ($7,6\pm 5,3$ anos vs.

10,4±7,3 anos, $p=0,019$). Contudo, quando se projectou a média do seguimento nas curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier constatou-se que foi idêntica para os doentes sem e com progressão ou recorrência da doença ($p=0,426$, teste log-rank). Por outro lado, ao se efectuar a análise do momento em que se diagnosticou a progressão ou recorrência verificou-se que o tempo decorrido para esta foi significativamente inferior ao tempo decorrido sem progressão (3,9±4,9 anos vs. 6,3±5,1 anos, $p=0,019$).

Durante o seguimento 16 doentes vieram a falecer sendo a percentagem significativamente superior nos doentes com progressão do tumor 13,8% vs. 4,4%, $p=0,020$. As curvas de Kaplan-Meier para a morte mostraram, igualmente, nos doentes com progressão ou recorrência do tumor, uma incidência maior de mortalidade ($p=0,002$, teste log-rank; figura 2).

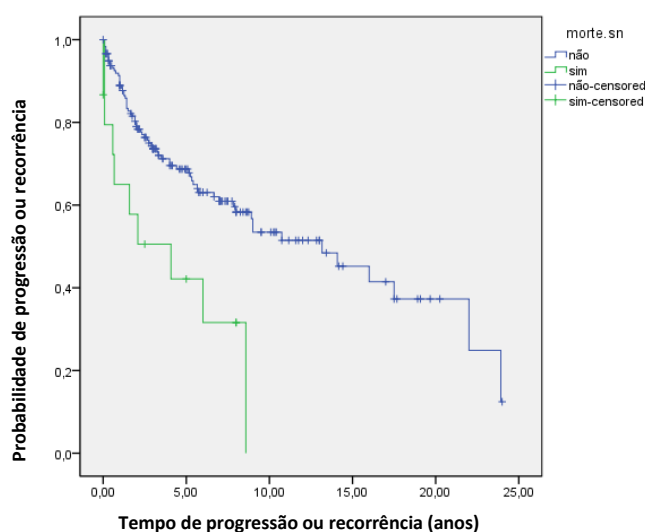


Figura 2. Curvas de Kaplan-Meier para a morte na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,002$, teste log-rank).

Tabela 13. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: diagnóstico e seguimento e factores preditivos de progressão ou recorrência*

	Total	Não ^a	Sim ^b	<i>p</i>
Género (%)				0,110
Feminino	103	66 (64,1)	37 (35,9)	
Masculino	91	48 (52,7)	43 (47,3)	
Total	194	114 (58,8)	80 (41,2)	
Idade de diagnóstico (anos)	56,0±14,1	55,9±14,1	54,8±14,1	0,529
Tempo de recorrência (anos)	5,3±5,2	6,3±5,1	3,9±4,9	0,019
Duração do seguimento (anos)	8,2±6,3	7,6±5,3	10,4±7,3	0,019
Perdidos para o seguimento (%)	51 (26,3)	29 (25,4)	22 (27,5)	0,748
Morte (%)	16 (8,2)	5 (4,4)	11 (13,8)	0,020

^aSem progressão ou recorrência; ^bCom progressão ou recorrência

Apresentação clínica

Embora a apresentação clínica tenha muito de subjectivo fez-se uma breve análise do que poderia ser um indicador de maior agressividade do tumor e que está esquematizada na tabela 14. Os tumores com progressão ou recorrência foram diagnosticados significativamente mais tarde, com uma duração média dos sintomas de $34,7 \pm 43,8$ meses vs. $21,0 \pm 32,6$ meses, $p=0,002$. Os sintomas neurológicos e endocrinológicos ocorreram em 73,8% e 53,8%, respectivamente, dos doentes com progressão da doença e com uma percentagem idêntica à da população sem progressão. Já os sintomas neuro-oftalmológicos foram significativamente mais frequentes nos casos em que houve progressão, 75,0% vs. 55,3%, $p=0,005$, particularmente os défices visuais (73,8% vs. 50,9%, $p=0,001$). Embora as parésias não tenham sido significativamente diferentes, verificou-se que estas foram mais frequentes no grupo sem progressão, com uma tendência para atingir o limiar da significância estatística (10,5% vs. 3,8%, $p=0,082$). O diagnóstico efectuado de forma incidental e a presença de outros tumores associados ocorreram em 10,0% e 13,8%, respectivamente, dos doentes com progressão da doença, percentagem semelhante à dos doentes sem progressão.

Tabela 14. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: apresentação clínica e factores preditivos de progressão ou recorrência*

	Total	Não ^a	Sim ^b	<i>p</i>
Duração dos sintomas (meses)	26,9±38,3	21,0±32,6	34,7±43,8	0,002
Sintomas neurológicos (%)	153 (78,9)	94 (82,5)	59 (73,8)	0,144
Sintomas neuro-oftalmológicos (%)				
Total	123 (63,4)	63 (55,3)	60 (75,0)	0,005
Défice visual	117 (60,3)	58 (50,9)	59 (73,8)	0,001
Parésias pares cranianos	15 (7,7)	12 (10,5)	3 (3,8)	0,082
Sintomas endocrinológicos (%)	95 (49,0)	52 (45,6)	43 (53,8)	0,264
Poliúria e polidipsia (%)	2 (1,1)	0 (0)	2 (1,8)	0,244
Incidentaloma (%)	25 (12,9)	17 (14,9)	8 (10,0)	0,315
Outros tumores associados (%)	23 (11,9)	12 (10,5)	11 (13,8)	0,494

^aSem progressão ou recorrência; ^bCom progressão ou recorrência

A comparação do valor preditivo dos sintomas significativos está expressa no quadro seguinte:

Sem progressão ou recorrência vs. com progressão ou recorrência		
	Odds Ratio (IC 95%)	<i>p</i>
Sintomas neuro-oftalmológicos	2,429 (1,298-4,544)	0,005
Défice visual	2,713 (1,461-5,036)	0,001

Projectando-se as variáveis atrás mencionadas nas curvas de Kaplan-Meier observou-se uma concordância dos resultados obtidos. Assim os sintomas neurológicos e

endocrinológicos foram idênticos em ambos os grupos ($p=0,404$, teste de log-rank e $p=0,320$, teste de log-rank, respectivamente). Os sintomas neuro-oftalmológicos, na sua globalidade, tenderam a ser mais frequentes no grupo com progressão da doença ($p=0,068$, teste de log-rank) mostrando-se individualmente os défices visuais mais prevalentes, embora não de forma significativa ($p=0,065$, teste de log-rank) nos doentes com progressão da doença. As parésias não evidenciaram, igualmente, uma diferença significativa entre os dois grupos, embora tenham ocorrido em maior número nos doentes sem progressão da doença ($p=0,172$, teste de log-rank).

Características dos tumores

As características dos tumores que foram analisadas estão expressas na tabela 15. Os tumores com comportamento mais agressivo tinham significativamente maiores dimensões e maior extensão e invasão. A média do maior diâmetro foi de 33,7 mm vs. 24,6 mm, $p<0,001$. Efectuando-se uma análise das curvas de ROC destes diâmetros poder-se-á admitir como valor de corte para um maior risco de recorrência aproximadamente os 20 milímetros (18 mm na amostra global, 17,5 mm no sexo feminino e 19,5 mm no masculino). Na classificação de Hardy observou-se igualmente, nos tumores com progressão ou recorrência, graus mais elevados ($p<0,001$), traduzindo tumores de maiores dimensões e com maior extensão e invasão. As extensões infra e para-selares foram de 61,5% e de 50% vs. 38,4% e 32,1%, respectivamente ($p=0,002$ e $p=0,013$). As invasões do seio cavernoso, do pavimento/óssea e do seio cavernoso associada à óssea foram de 31,3%, 58,8% e 23,8% vs. 14,9%, 36,0% e 6,1%, respectivamente ($p=0,007$, $p=0,002$ e $p<0,001$). A presença de áreas quísticas e de necrose foram idênticas em ambos os grupos. Já a presença de hemorragia/apoplexia foi significativamente mais frequente nos doentes sem progressão da doença, 14,9% vs. 5,0%, $p=0,029$. No que diz respeito ao tipo de tumor, pela identificação imunohistoquímica, não se verificaram diferenças entre os grupos, nomeadamente para os tumores não secretores, gonadotrofinomas e corticotrofinomas silenciosos. A avaliação do índice de proliferação celular pelo MIB-1/Ki-67 só foi efectuada em 53 doentes, em 28 sem progressão ou recorrência e em 25 com progressão ou recorrência. Foram diagnosticados três adenomas atípicos, dois no grupo sem progressão e um no grupo com progressão.

Tabela 15. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: características dos tumores e factores preditivos de progressão ou recorrência*

	Total	Não ^a	Sim ^b	<i>p</i>
Dimensões (mm)				
Diâmetro maior	28,2±9,9	24,6±8,8	33,7±8,8	<0,001
Classificação de Hardy (%)				<0,001
Grau II	65 (35,1)	54 (48,6)	11 (14,9)	
Grau III	48 (25,9)	28 (25,2)	20 (27,0)	
Grau IV	72 (38,9)	29 (26,1)	43 (58,1)	
Extensão extra-selar (%)				
Supra-selar	182 (95,8)	108 (96,4)	74 (94,9)	0,599
Infra-selar	91 (47,9)	43 (38,4)	48 (61,5)	0,002
Para-selar	75 (39,5)	36 (32,1)	39 (50,0)	0,013
Invasão (%)				
Seio cavernoso	42 (21,6)	17 (14,9)	25 (31,3)	0,007
Pavimento/óssea	88 (45,4)	41 (36,0)	47 (58,8)	0,002
Seio esfenoidal	43 (22,2)	22 (19,3)	21 (26,3)	0,251
Seio cavernoso e pavimento	26 (13,4)	7 (6,1)	19 (23,8)	<0,001
Aspectos do tumor (%)				
Áreas quísticas e necrose	25 (12,9)	14 (12,3)	11 (13,8)	0,764
Hemorragia/apoplexia	21 (10,8)	17 (14,9)	4 (5,0)	0,029
Imunohistoquímica (%)				
Não secretor	88 (45,4)	51 (44,8)	37 (46,3)	0,835
FSH/LH/SUα-positivo	55 (28,4)	27 (23,7)	28 (35,0)	0,085
ACTH-positivo	11 (5,7)	7 (6,1)	4 (5,0)	0,735
TSH-positivo	7 (3,6)	6 (5,3)	1 (1,3)	—
Prolactina-positivo	1 (0,5)	1 (0,9)	0 (0)	—
GH-positivo	1 (0,5)	1 (0,9)	0 (0)	—
Plurihormonal	5 (2,6)	3 (2,6)	2 (2,5)	—
Não funcionante	26 (13,4)	18 (15,8)	8 (10,0)	—
Adenoma atípico ^c (%)	3 (5,7)	2 (7,1)	1 (4,0)	—

^aSem progressão ou recorrência; ^bCom progressão ou recorrência;

^cKi-67 só efectuado em 53 doentes (28 sem e 25 com progressão ou recorrência)

A comparação do valor preditivo dos parâmetros significativos está expressa no quadro seguinte:

Sem progressão ou recorrência vs. com progressão ou recorrência		
	Odds Ratio (IC 95%)	<i>p</i>
Extensão infra-selar	2,567 (1,417-4,651)	0,002
Extensão para-selar	2,111 (1,164-3,828)	0,013
Invasão seio cavernoso	2,594 (1,289-5,219)	0,007
Invasão pavimento/óssea	2,536 (1,410-4,561)	0,002
Invasão seio cavernoso e pavimento	4,761 (1,894-11,969)	<0,001
Hemorragia/apoplexia	0,300 (0,097-0,929)	0,029

Analisando estas variáveis nas curvas de Kaplan-Meier verificou-se concordância dos resultados obtidos. Quando se analisou o maior diâmetro dos tumores e se estimou como valor de corte, pelas curvas de ROC, para maior risco de recorrência os 20 mm observou-se uma associação significativa nas curvas de Kaplan-Meier ($p=0,001$, teste log-rank; figura 3).

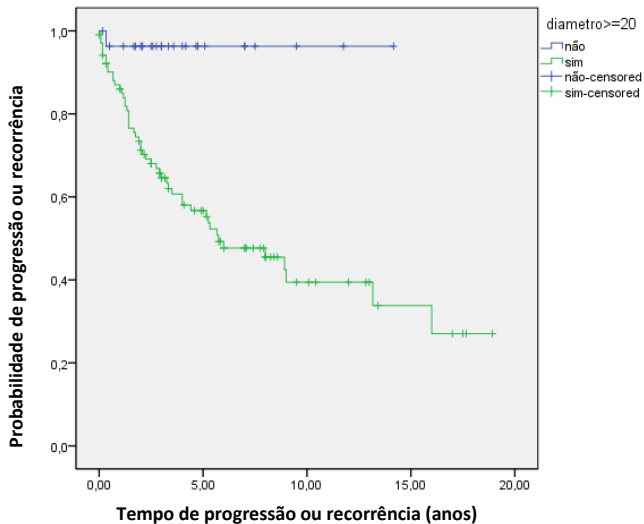


Figura 3. Curvas de Kaplan-Meier para o maior diâmetro do tumor ≥ 20 mm na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,001$, teste de log-rank).

A classificação de Hardy, relacionada com a dimensão, extensão e invasão dos tumores, mostrou claramente um aumento do risco de progressão ou recorrência associado a um maior grau de Hardy ($p<0,001$, teste log-rank; figura 4)

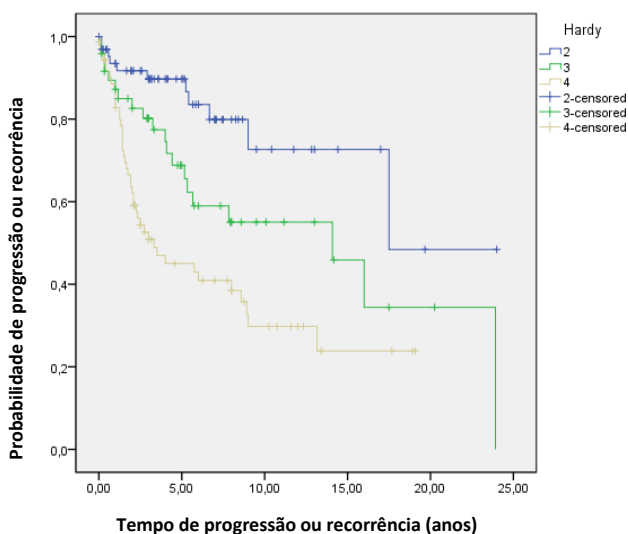


Figura 4. Curvas de Kaplan-Meier para a classificação de Hardy na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p<0,001$, teste de log-rank).

A extensão supra-selar não se correlacionou com o risco de progressão ($p < 0,738$, teste log-rank) mas as extensões infra e para-selares estiveram significativamente associadas a maior progressão do tumor ($p = 0,008$, teste log-rank; figura 5 e $p = 0,010$, teste log-rank; figura 6).

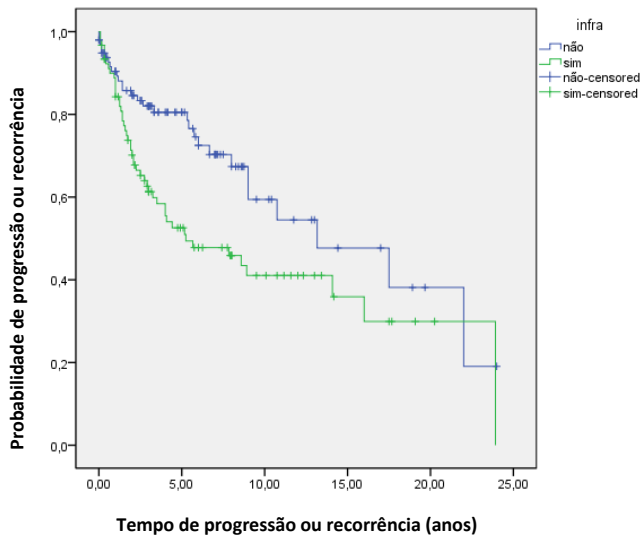


Figura 5. Curvas de Kaplan-Meier para a extensão infra-selar na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p = 0,008$, teste de log-rank).

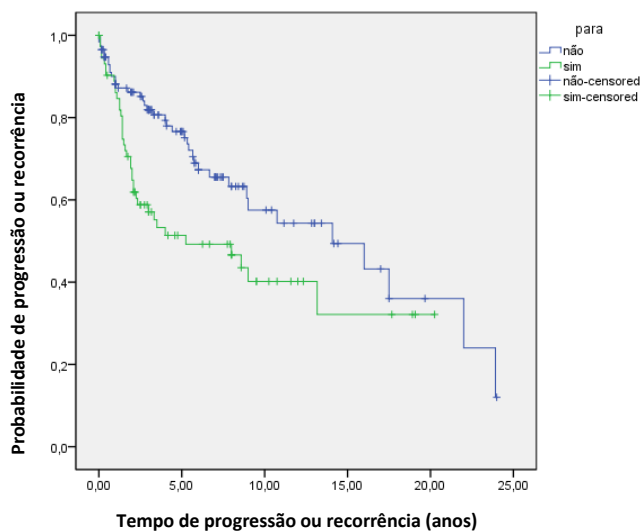


Figura 6. Curvas de Kaplan-Meier para a extensão para-selar na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p = 0,010$, teste de log-rank).

A invasão dos seios cavernosos, pavimento/óssea e de ambos (seio cavernoso e pavimento/óssea) mostraram-se igualmente significativamente associadas à progressão do tumor ($p = 0,001$, teste log-rank; figura 7, $p = 0,008$, teste log-rank; figura 8 e $p < 0,001$,

teste log-rank; figura 9, respectivamente) ao passo que tal não aconteceu para a invasão do seio esfenoidal ($p=0,349$, teste log-rank).

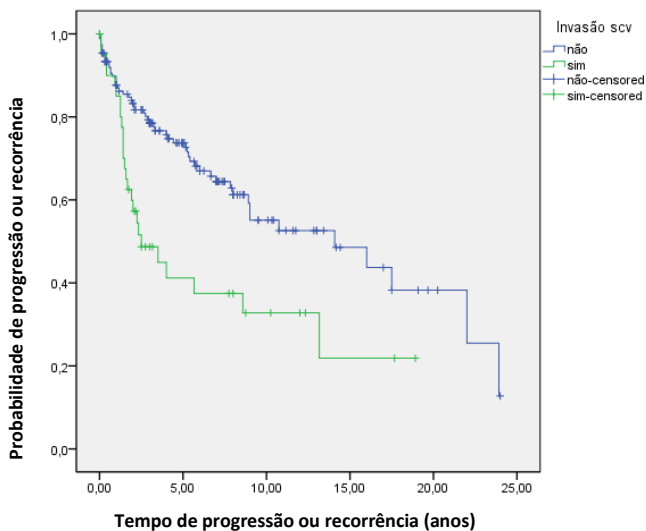


Figura 7. Curvas de Kaplan-Meier para a invasão do seio cavernoso na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,001$, teste de log-rank).

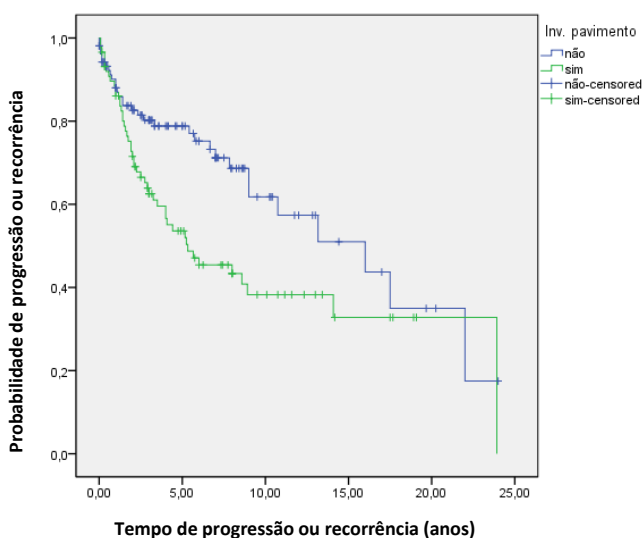


Figura 8. Curvas de Kaplan-Meier para a invasão do pavimento/óssea na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,008$, teste de log-rank).

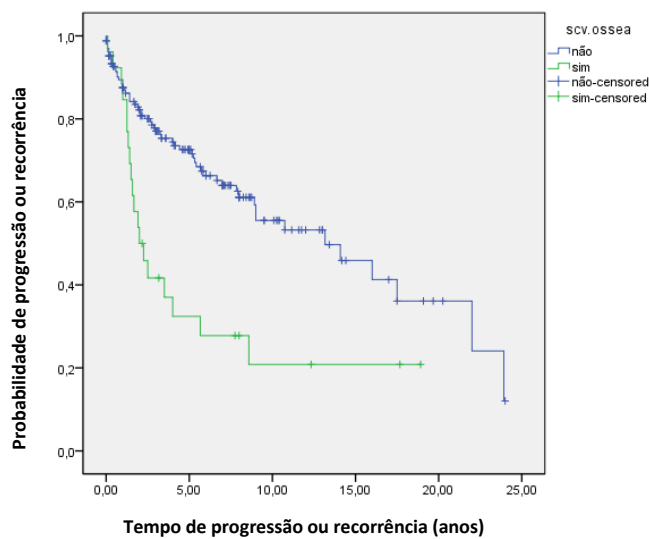


Figura 9. Curvas de Kaplan-Meier para a invasão do seio cavernoso e pavimento/óssea na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p < 0,001$, teste de log-rank).

Tumores que tenham sofrido hemorragia/apoplexia associaram-se a uma significativa menor progressão ou recorrência ($p = 0,043$, teste log-rank; figura 10), sendo a progressão idêntica para a hemorragia clínica *versus* a sub-clínica ($p = 0,796$, teste log-rank).

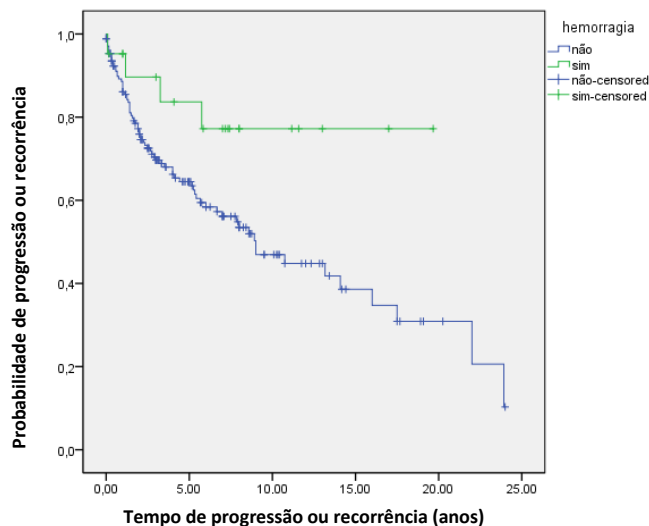


Figura 10. Curvas de Kaplan-Meier para a hemorragia/apoplexia na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p = 0,043$, teste de log-rank).

O tipo imunohistoquímico de tumor só foi analisado para os três tipos com maior número de doentes, os tumores não secretores, os gonadotrofinomas e os corticotrofinomas silenciosos. A tendência que foi observada para uma maior progressão do tumor nos gonadotrofinomas tornou-se significativa quando a análise foi projectada nas curvas de Kaplan-Meier ($p = 0,009$, teste log-rank; figura 11). Os tumores não secretores e os

corticotrofinomas foram idênticos em ambos os grupos, sem e com progressão do tumor ($p=0,903$, teste log-rank e $p=0,823$, teste log-rank, respectivamente).

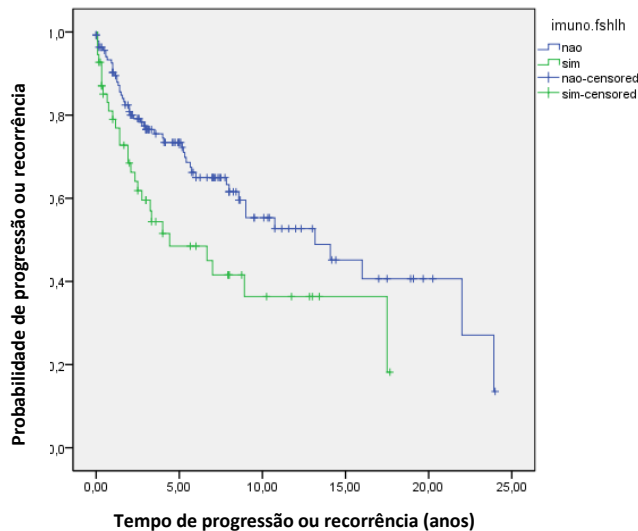


Figura 11. Curvas de Kaplan-Meier para o tipo imunohistoquímico (FSH/LH/SU α) na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,009$, teste de log-rank).

Avaliação pré e pós-operatórias: função hipofisária e estudo oftalmológico

O estudo da função hipofisária e a avaliação oftalmológica pré-operatórias estão sintetizados na tabela 16. Os doentes com progressão da doença tiveram globalmente um importante, maior e significativo défice da função hipofisária do que os sem progressão da doença. Apenas os défices gonadal, cortico supra-renal e a IGF1 se localizaram no limiar da significância estatística ($p=0,053$; $p=0,088$ e $p=0,056$, respectivamente). A média da prolactinemia e a hiperprolactinemia, embora superiores nos doentes com progressão da doença, não foram significativamente diferentes dos sem progressão. Relativamente aos défices visuais também se verificou um nítido maior défice nos doentes com progressão da doença, 85,9% vs. 68,3%, $p<0,001$.

Tabela 16. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: estudo endocrinológico e oftalmológico pré tratamento e factores preditivos de progressão ou recorrência*

	n ^c	Total	Não ^a	Sim ^b	p
Deficiências hipofisárias (%)					
GH	73	62 (84,9)	29 (76,3)	33 (94,3)	0,032
FSH/LH	164	118 (72,0)	68 (62,7)	50 (80,6)	0,053
TSH	155	40 (25,8)	18 (18,9)	22 (36,7)	0,046
ACTH	180	45 (25,0)	17 (16,8)	28 (35,4)	0,088
Prolactina					
Média (ng/mL)	165	25,5±24,8	23,1±21,2	29,5±29,5	0,102
Hiperprolactinemia ^d (%)		72 (43,6)	43 (42,1)	29 (46,9)	0,626
Défice IGF1 (%)	114	44 (38,6)	23 (31,9)	21 (50,0)	0,056
Défice visual (%)					
Défice acentuado	175	132 (75,4)	71 (68,3)	61 (85,9)	<0,001
Défice parcial		123 (70,3)	62 (59,6)	61 (85,9)	
		9 (5,1)	9 (8,7)	0 (0)	

^aSem progressão ou recorrência; ^bCom progressão ou recorrência

^cNúmero de doentes com estudo pré tratamento; ^dValor superior a 20 ng/mL

A comparação do valor preditivo dos parâmetros significativos está expressa no quadro seguinte:

Sem progressão ou recorrência vs. com progressão ou recorrência		
	Odds Ratio (IC 95%)	p
Défice GH	0,195 (0,039-0,978)	0,032
Défice TSH	0,517 (0,269-0,993)	0,046

A avaliação após o tratamento está representada na tabela 17. As deficiências da função hipofisária foram importantes em ambos os grupos e significativamente superiores nos doentes com progressão da doença, para o sector gonadal e tiroideu ($p=0,006$ e $p=0,004$). O défice do sector da somatotrofina foi superior a oitenta por cento e idêntico em ambos os grupos, e o défice do sector cortico supra-renal superior a trinta por cento, embora semelhante em ambos os grupos de doentes, mostrou uma tendência para ser significativamente maior no grupo com progressão ($p=0,088$). A insuficiência ante-hipofisária global foi igualmente superior quando houve progressão da doença e de forma significativa, 40,3% vs. 26,4%, $p=0,045$. A média da prolactinemia e a hiperprolactinemia foram semelhantes em ambos os grupos. A diabetes insípida foi igualmente superior nos doentes em que houve progressão da doença, particularmente quando permanente (11,7% vs. 3,5%), embora não de forma significativa ($p=0,090$). Os défices visuais foram significativamente superiores nos doentes com progressão da doença (62,7% vs. 40,9%, $p<0,001$), particularmente os défices mais acentuados (36,0% vs. 11,4%).

Tabela 17. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: estudo endocrinológico e oftalmológico após tratamento e factores preditivos de progressão ou recorrência*

	n ^c	Total	Não ^a	Sim ^b	p
Deficiências hipofisárias (%)					
GH	90	80 (88,9)	38 (84,4)	42 (93,3)	0,180
FSH/LH	188	138 (73,4)	74 (66,1)	64 (84,2)	0,006
TSH	184	89 (48,4)	43 (39,4)	46 (61,3)	0,004
ACTH	187	70 (37,4)	36 (32,4)	34 (44,7)	0,088
Prolactina					
Média (ng/mL)	165	10,7±8,9	10,1±8,8	11,7±9,0	0,105
Hiperprolactinemia ^d (%)		20 (11,1)	11 (10,6)	9 (11,8)	0,790
Défice IGF1 (%)	163	81 (49,7)	38 (40,4)	43 (62,3)	0,006
Panhipopituitarismo (%)	187	60 (32,1)	29 (26,4)	31 (40,3)	0,045
Diabetes insípida (%)					
Transitória	190	14 (7,4)	9 (8,0)	5 (6,5)	
Permanente		13 (6,8)	4 (3,5)	9 (11,7)	
Défice visual (%)					
Défice acentuado	180	90 (50,0)	43 (40,9)	47 (62,7)	<0,001
Défice parcial		39 (21,7)	12 (11,4)	27 (36,0)	
		51 (28,3)	31 (29,5)	20 (26,7)	

^aSem progressão ou recorrência; ^bCom progressão ou recorrência

^cNúmero de doentes com estudo pré tratamento; ^dValor superior a 20 ng/mL

A comparação do valor preditivo dos parâmetros significativos está expressa no quadro seguinte:

Sem progressão ou recorrência vs. com progressão ou recorrência		
	Odds Ratio (IC 95%)	p
Défice FSH/LH	0,365 (0,176-0,758)	0,006
Défice TSH	0,411 (0,225-0,751)	0,004
Défice IGF1	0,410 (0,217-0,776)	0,006
Panhipopituitarismo	1,882 (1,010-3,507)	0,045

Nas curvas de Kaplan-Meier apenas se mostraram associadas ao prognóstico de progressão ou recorrência as insuficiências hipofisárias após o tratamento. Os défices do sector tiroideu e de IGF1 foram significativos ($p=0,032$, teste log-rank; figura 12 e $p=0,004$, teste log-rank; figura 13, respectivamente) e a insuficiência gonadal ficou no limite da significância estatística ($p=0,069$, teste log-rank), o que pode traduzir a maior agressividade dos tumores e consequente iatrogenia das terapêuticas. As insuficiências antes do tratamento, a insuficiência do sector cortico supra-renal e a insuficiência ante-hipofisária global após o tratamento e a hiperprolactinemia (>20 ng/mL), antes e após o tratamento, foram idênticas nos doentes sem e com progressão da doença.

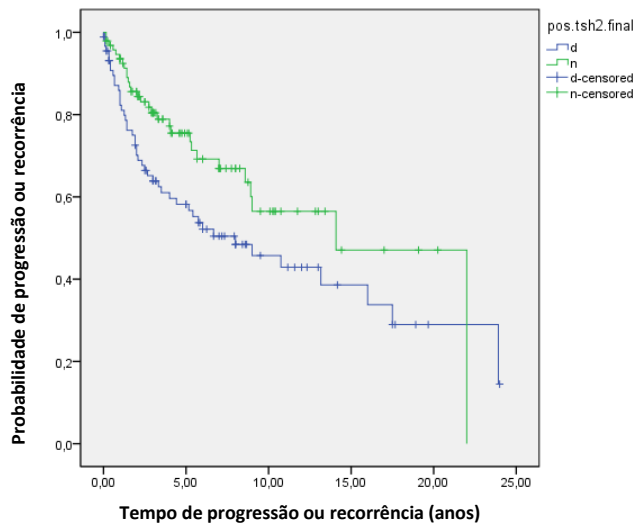


Figura 12. Curvas de Kaplan-Meier para o déficit do sector tiroideu após tratamento na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,032$, teste de log-rank).

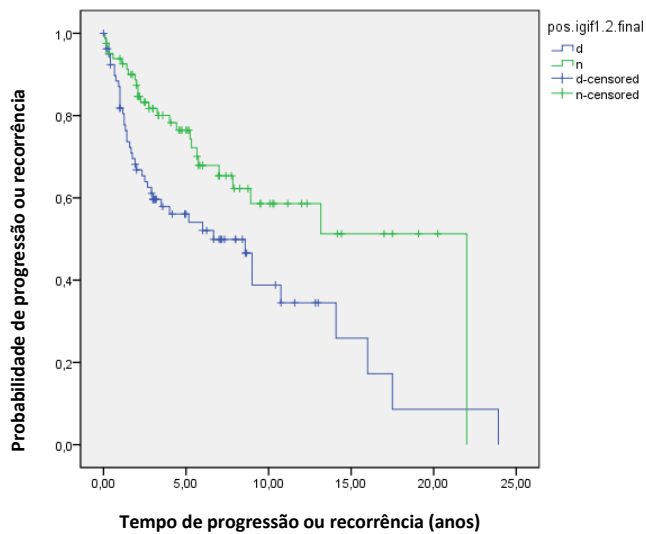


Figura 13. Curvas de Kaplan-Meier para o déficit de IGF1 após tratamento na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,004$, teste de log-rank).

Os défices visuais antes e após o tratamento mostraram-se significativamente associados ao prognóstico de recorrência ($p=0,010$, teste log-rank; figura 14 e $p=0,005$, teste log-rank; figura 15, respectivamente).

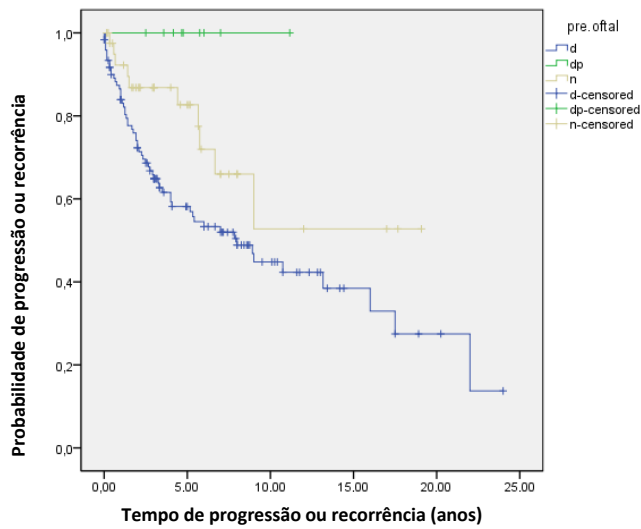


Figura 14. Curvas de Kaplan-Meier para os défices visuais pré tratamento na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,010$, teste de log-rank).

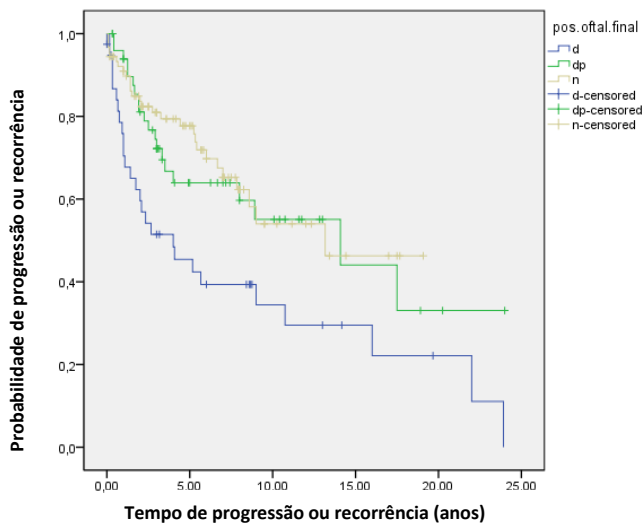


Figura 15. Curvas de Kaplan-Meier para os défices visuais após tratamento na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p=0,005$, teste de log-rank).

A análise do estudo hormonal nos doentes com ambas as avaliações, antes e após tratamento, está explicitada na tabela 18. Analisando as diferentes variáveis da função hipofisária verificou-se uma elevada percentagem de insuficiências (superior a cinquenta por cento) quer nos doentes sem quer nos com progressão da doença. Faz-se notar que, após o tratamento, as insuficiências foram ainda mais prevalentes nos doentes com progressão dos tumores, reflectindo provavelmente a maior dimensão e agressividade dos tumores e das conseqüentes terapêuticas efectuadas. Realça-se o aumento significativo das insuficiências tiroideia e cortico supra-renal. As insuficiências da somatotrofina e gonadal já eram previamente elevadas, motivo pelo que qual não se pode observar grande

agravamento. Quer a média da prolactinemia, quer a hiperprolactinemia foram significativamente superiores antes do tratamento em ambos os grupos.

Tabela 18. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: estudo endocrinológico pré e após tratamento nos doentes com ambas as avaliações e factores preditivos de progressão ou recorrência*

Défice	n (N ^a /S ^b)	Total		Não ^a			Sim ^b		
		Pré (%)	Pós (%)	Pré (%)	Pós (%)	p	Pré (%)	Pós (%)	p
GH	53 28/25	92,5	88,7	87,7	82,1	0,564	100,0	96,0	0,317
FSH/LH	158 100/58	71,5	72,2	67,0	66,0	0,808	79,3	82,8	0,527
TSH	153 96/57	39,2	45,8	34,4	35,4	0,827	47,4	63,2	0,039
ACTH	149 92/57	26,2	37,6	8,7	29,3	0,039	36,8	50,9	0,046
IGF1	101 64/37	41,6	47,5	34,4	36,0	0,808	54,1	67,6	0,096
PRL (ng/mL)	152 93/59	27,1± 26,0	10,1± 7,4	23,4± 21,8	9,0± 6,6	<0,001	30,8± 30,0	11,2± 8,2	<0,001
PRL >20 ng/mL (%)	152 93/59	44,1	8,6	40,9	7,5	<0,001	49,2	10,2	<0,001

^aSem progressão ou recorrência; ^bCom progressão ou recorrência

A análise do estudo oftalmológico antes e após o tratamento está representada na tabela 19. Globalmente o tratamento instituído melhorou de forma significativa os défices visuais em ambos os grupos. No entanto refere-se uma percentagem mais elevada de persistência de défices visuais nos doentes com progressão dos tumores, o que poderá igualmente reflectir uma maior agressividade destes.

Tabela 19. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: estudo oftalmológico pré e após tratamento nos doentes com ambas as avaliações e factores preditivos de progressão ou recorrência*

Visão	Total (n=165)			Não ^a (n=98)			Sim ^b (n=67)		
	Pré (%)	Pós (%)	p	Pré (%)	Pós (%)	p	Pré (%)	Pós (%)	p
Défice acentuado	70,3	21,8	<0,001	59,2	10,2	<0,001	86,6	38,8	<0,001
Défice parcial	5,5	10,3		9,2	31,6		0,0	25,4	
Normal	24,2	49,1		31,6	58,2		13,4	35,8	

^aSem progressão ou recorrência; ^bCom progressão ou recorrência

Tratamento cirúrgico e radioterapia

O sumário do tratamento realizado está representado na tabela 20. Nos doentes em que houve progressão da doença foi efectuado um número maior de cirurgias transcranianas, 26,2% vs. 4,4%, $p < 0,001$. Nos doentes sem progressão da doença, a remoção aparentemente total do tumor após a primeira cirurgia foi significativamente superior relativamente aos doentes com progressão, 83,0% vs. 57,5%, $p < 0,001$. Nos doentes tratados com radioterapia complementar à primeira cirurgia, verificou-se uma taxa de progressão da doença significativamente inferior, 80,0% vs. 27,8%, $p = 0,034$.

Tabela 20. *Macroadenomas clinicamente não funcionantes: cirurgia, radioterapia e factores preditivos de progressão ou recorrência*

	Total	Não ^a	Sim ^b	<i>p</i>
Tipo de cirurgia ^c (%)				<0,001
Transesfenoidal	185 (85,3)	109 (95,6)	76 (73,8)	
Transcraniana	32 (14,7)	5 (4,4)	27 (26,2)	
Tipo de remoção 1ª cirurgia (%)				<0,001
Parcial	50 (27,0)	19 (17,0)	31 (42,5)	
Macroscópica total	135 (73,0)	93 (83,0)	42 (57,5)	
Radioterapia após 1ª cirurgia ^d (%)	9 (39,1)	4 (80,0)	5 (27,8)	0,034

^aSem progressão ou recorrência; ^bCom progressão ou recorrência; ^cDoentes operados, n=185; ^dDoentes irradiados, n=23

A comparação do valor preditivo dos parâmetros significativos está expressa no quadro seguinte:

Sem progressão ou recorrência vs. com progressão ou recorrência		
	Odds Ratio (IC 95%)	<i>p</i>
Tipo remoção cirúrgica: parcial vs. total	0,277 (0,141-0,545)	<0,001
Radioterapia	10,4 (0,923-117,2)	0,034

Nas curvas de Kaplan-Meier o tipo de remoção cirúrgica na primeira cirurgia e a radioterapia após a primeira cirurgia revelaram-se igualmente muito significativas para o prognóstico de progressão da doença, estando a remoção parcial associada a essa progressão ($p < 0,001$, teste log-rank; figura 16) e a radioterapia coadjuvante da primeira cirurgia a uma menor progressão ou recorrência dos tumores ($p < 0,001$, teste log-rank; figura 17).

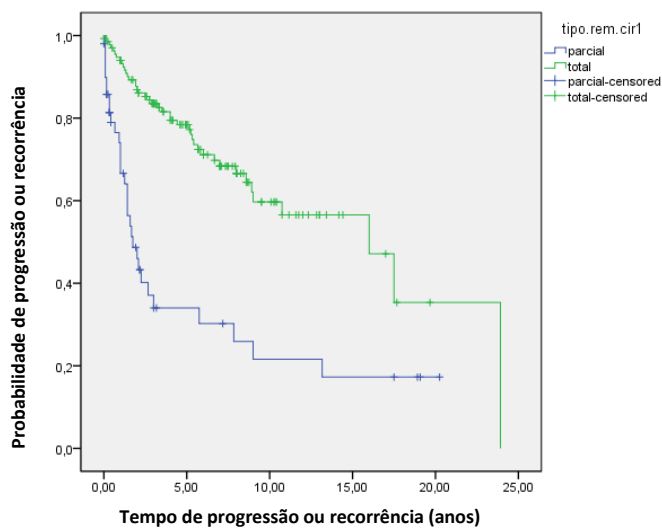


Figura 16. Curvas de Kaplan-Meier para o tipo de remoção cirúrgica na primeira cirurgia na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p < 0,001$, teste de log-rank).

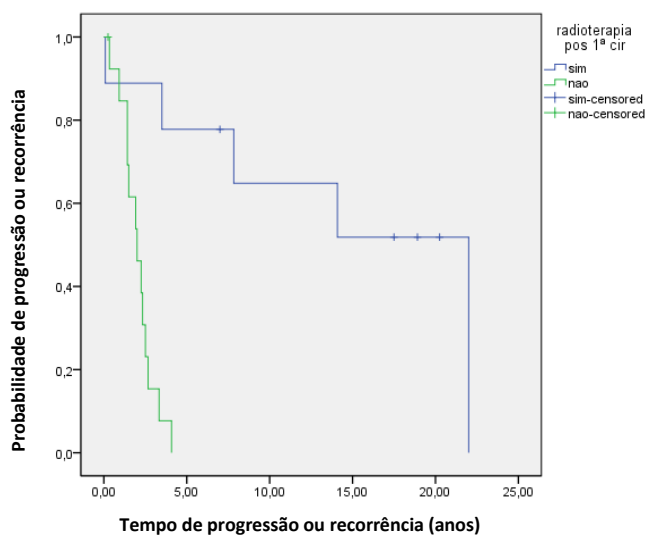


Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier para a radioterapia após a primeira cirurgia na avaliação da progressão ou recorrência dos tumores ($p < 0,001$, teste de log-rank).

Finalmente ao efectuar-se a análise de regressão uni e multivariada de Cox para confirmação dos resultados obtidos e para se verificar quais os factores mais determinantes como preditivos da progressão ou recorrência do tumor, constatou-se que os mais importantes foram: as dimensões do tumor, nomeadamente diâmetro máximo superior a 20 mm ($HR\ 9,272$, $p=0,028$) e o tipo de remoção aparentemente total aquando da primeira cirurgia ($HR\ 0,314$, $p < 0,001$). Analisando apenas os doentes submetidos a radioterapia após a primeira cirurgia aquela revelou-se o factor mais determinante embora, devido ao pequeno número de doentes, não fosse passível de aplicação do modelo estatístico e cálculo do *hazard ratio*.

2. Estudo molecular

2.1. Genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1*

Gene *CYP2D6*

As frequências genotípicas *CYP2D6**1/*1, *CYP2D6**1/*4, *CYP2D6**4/*4 foram 68,1%, 29,3%, 2,6%, respectivamente, nos doentes e 57,6%, 36,0%, 6,4% nos controlos, aproximando-se a sua diferença do limiar de significância estatística (χ^2 2g.l.=5,77, $p=0,056$; χ^2 1g.l.=3,07, $p=0,080$). As frequências alélicas *CYP2D6**1 e *CYP2D6**4, nos doentes, foram 82,7% e 17,3%, respectivamente, e 75,6%, 24,4% nos controlos, evidenciando uma diferença significativa entre os dois grupos (χ^2 2g.l.=5,63, $p=0,018$). Não foram detectadas diferenças quando a análise foi efectuada de acordo com o tipo histológico do tumor (tabela 1).

Tabela 1. Genótipo e frequências alélicas do gene *CYP2D6*

Populações e tumores	n	Genótipos <i>CYP2D6</i> (%)			Alelos (%)	
		*1/*1	*1/*4	*4/*4	*1	*4
Grupo de controlo	256	159 (62,1)	83 (32,4)	14 (5,5)	242 (78,3)	14 (21,7)
Total de doentes	235	165 (71,4)	64 (27,2)	6 (2,6) ^a	239 (83,8)	6 (16,2) ^b
Tumores não secretores	65	47 (72,3)	17 (26,2)	1 (1,5)	111 (85,4)	19 (14,6)
Somatotrofinomas	64	45 (70,3)	19 (29,7)	0	109 (85,2)	19 (14,8)
Macroprolactinomas	58	37 (63,8)	18 (31,0)	3 (5,2)	92 (79,3)	24 (20,7)
Corticotrofinomas	27	19 (70,4)	6 (22,2)	2 (7,4)	44 (81,5)	10 (18,5)
Gonadotrofinomas	12	10 (83,3)	2 (16,7)	0	22 (91,7)	2 (8,3)
Tirotrofinomas	2	2	0	0	4	0
Adenomas pluri-hormonais	2	2	0	0	4	0
Tumores clinicamente não funcionantes	5	3	2	0	8	2

*CYP2D6**1, metabolizador activo; *CYP2D6**4, metabolizador 'lento'

^avs. grupo controlo, χ^2 1g.l.=2,98, $p=0,084$, (*CYP2D6**4/*4 vs. todos os outros), χ^2 2g.l.=4,88, $p=0,087$, (todos os genótipos); ^bvs. grupo controlo, χ^2 1g.l.=6,28, $p=0,012$

Genes *GSTM1* e *GSTT1*

As frequências genotípicas *GSTM1* e *GSTM1**0 foram 45,5% e 54,5%, respectivamente, nos doentes e 43% e 57% nos controlos, não havendo diferença significativa entre os grupos (χ^2 1g.l.=0,33, $p=0,57$). As frequências genotípicas *GSTT1* e *GSTT1**0 foram 82,5% e 17,5%, respectivamente, nos doentes e 81,6% e 18,4% nos controlos, não havendo igualmente diferença significativa entre os grupos (χ^2 1g.l.=0,058, $p=0,81$) (tabela 2).

Tabela 2. Frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1*

Populações e tumores	n	Genótipos <i>GSTM1</i> (%)		Genótipos <i>GSTT1</i> (%)	
		(+)	(0)	(+)	(0)
Grupo de controlo	256	110 (43,0)	146 (57,0)	209 (81,6)	47 (18,4)
Total de doentes	235	107 (45,5)	128 (54,5) ^a	193 (82,5)	41 (17,5) ^b
Tumores não secretores	65	33 (50,8)	32 (49,2)	53 (81,5)	12 (18,5)
Somatotrofinomas	64	28 (43,8)	36 (56,2)	53 (82,8)	11 (17,2)
Macroprolactinomas	58	27 (46,6)	31 (53,4)	47 (82,5)	10 (17,5)
Corticotrofinomas	27	10 (37,0)	17 (63,0)	23 (85,2)	4 (14,8)
Gonadotrofinomas	12	9 (75,0)	3 (25,0)	10 (83,3)	2 (16,7)
Tirotrofinomas	2	0	2	2	0
Tumores pluri-hormonais	2	1	1	2	0
Tumores clinicamente não funcionantes	5	0	5	3	2

(+) Gene presente em homozigotia ou heterozigotia; (0) Delecção em homozigotia (*GSTM1**0/*0 ou *GSTT1**0/*0)

^avs. grupo controlo, χ^2 1g.l.=0,33, $p=0,57$; ^bvs. grupo controlo, χ^2 1g.l.=0,058, $p=0,81$

Quando os adenomas foram divididos de acordo com o seu tipo histológico não se observou qualquer diferença significativa entre os diferentes subgrupos e o grupo controlo para os diferentes polimorfismos dos três genes analisados.

2.2. Gene *AIP*

Neste grupo de doentes com somatotrofinomas e mamossomatotrofinomas, aparentemente esporádicos, não foram detectadas mutações germinais no gene *AIP*. Em um doente foi identificado um novo polimorfismo sinónimo (Asp45Asp) no exão 2. Na tabela 3 descrevem-se as características clínicas e o resultado do estudo molecular dos 20 doentes estudados.

Tabela 3. *Características clínicas, imunohistoquímicas e estudo molecular do gene AIP*

N	Id. diag. (anos)	Sexo	Apresentação clínica	Imunohistoquímica	AIP
1	24	F	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT ^a
2	30	M	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
3	30	M	Acromegalia/microadenoma	GH	WT
4	33	M	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
5	27	F	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
6	27	F	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
7	24	F	Acromegalia/macroadenoma	GH+PRL	WT
8	23	F	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
9	27	F	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
10	28	F	Acromegalia/macroadenoma	GH+PRL	WT
11	29	F	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
12	16	M	Gigantismo/macroadenoma	GH+PRL	WT
13	24	F	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
14	25	M	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
15	29	M	Acromegalia/macroadenoma	GH	Asp45Asp
16	33	F	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT
17	19	M	Acromegalia/macroadenoma	GH+PRL	WT
18	19	M	Acromegalia/macroadenoma	GH+PRL, atípico	WT
19	17	F	Acromegalia/macroadenoma	GH+PRL	WT
20	30	F	Acromegalia/macroadenoma	GH	WT

^aWT, *wild type*

Na figura 3 apresenta-se o resultado da sequenciação do exão 2 com a identificação do novo polimorfismo sinónimo (Asp45Asp).

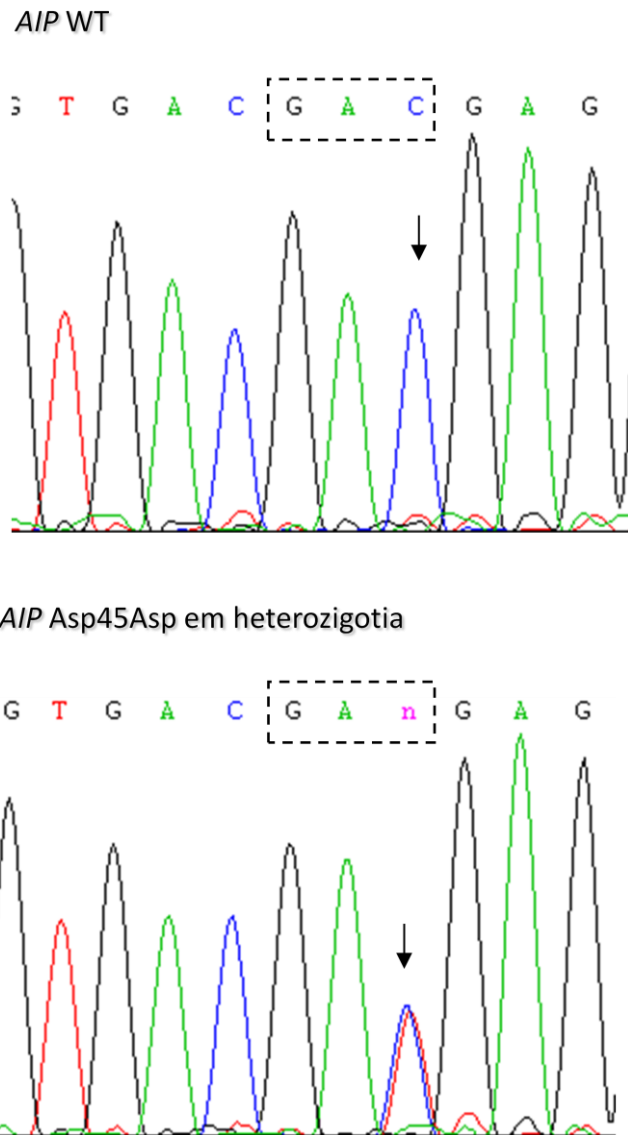


Figura 3. Sequenciação de exão 2 do gene *AIP*

O estudo do gene *AIP* no tecido tumoral não foi realizado uma vez que não foram encontradas mutações germinais neste grupo, aparentemente de maior risco, e pelo facto de outros autores já terem demonstrado não se verificarem mutações somáticas na quase totalidade dos tumores hipofisários aparentemente esporádicos. Por conseguinte seria um trabalho dispendioso, não original e que pouco acrescentaria a esta investigação. A expressão da proteína *AIP* por imunohistoquímica seria o objectivo seguinte mas não foi efectuada por falta de recursos humanos, técnicos e tempo útil para a sua realização. Contudo trabalhos muito recentes vieram a demonstrar, embora ainda de uma forma pouco sólida, a associação da sua sub-expressão nos somatotrofinomas mais agressivos. Nos tumores clinicamente não funcionantes observou-se uma sobre-expressão associada a índices de proliferação celular mais elevados, mas não a maior agressividade do tumor.⁶⁰³

V. DISCUSSÃO

Os tumores da hipófise aparentemente têm origem em um tipo celular das células hipofisárias anteriores e representam, aproximadamente, 10% a 25% dos tumores intracranianos,¹⁵⁵ sendo os clinicamente não funcionantes os mais frequentes no adulto.⁴⁰⁶ A identificação dos tumores com síndromes de hiperprodução hormonal é relativamente simples devido às manifestações clínicas decorrentes dessa secreção hormonal. No entanto, nos tumores que não se acompanham de qualquer síndrome de hiperprodução hormonal, os tumores clinicamente não funcionantes, o diagnóstico torna-se mais difícil baseando-se apenas na sintomatologia decorrente do efeito de massa. Qualquer tipo de tumor pode ser não funcionante, quer por uma secreção hormonal *subtil* ou subnormal (silenciosos), quer mesmo pela total incapacidade de secreção hormonal pelo tumor. Até ao momento tem sido difícil identificar factores seguros que possam prever o comportamento e agressividade destes tumores e consequentemente qual a melhor atitude para o tratamento e seguimento de cada doente. Este trabalho constituiu uma análise retrospectiva da experiência do Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC, EPE em 236 doentes com tumores hipofisários clinicamente não funcionantes, com um longo seguimento. Globalmente, e tendo como base apenas os resultados deste trabalho, poder-se-á afirmar que os factores que mais impacto tiveram na predição do comportamento biológico e prognóstico destes tumores foram os clínicos. Os resultados moleculares em diferentes tipos de tumores, funcionantes e não funcionantes, não se mostraram particularmente determinantes nesta questão. No entanto, é necessário afirmar que o estudo molecular não foi de forma alguma exaustivo pelo que a generalização da sua menor relevância não poderá ser feita.

1. Estudo clínico

1.1. Amostra global

Na amostra global verificou-se uma frequência quase idêntica destes tumores em ambos os géneros. A idade média de diagnóstico (56,3 anos), embora superior no sexo masculino e de forma mais expressiva dada pelo valor da mediana (60 anos vs. 54,5 anos), não foi diferente da do sexo feminino. A maioria (93,6%) foi diagnosticada como macroadenomas. A ocorrência destes no sexo masculino foi de cerca de 3,5 vezes superior relativamente ao sexo feminino, e com tumores de maiores dimensões (média do diâmetro máximo 28,6±9,5 mm vs. 24,7±12,6 mm, $p=0,005$). Quanto à sua extensão e invasão, dadas indirectamente pela classificação de Hardy, não se observaram diferenças significativas entre os géneros. A quase totalidade dos tumores foi diagnosticada nas duas últimas décadas o que se deve, provavelmente, à introdução dos meios tecnológicos de imagem mais sofisticados, à melhor articulação com a Neurocirurgia e ao seguimento em um Serviço de Endocrinologia. Ao longo destas décadas não se verificou que tenha ocorrido um diagnóstico mais precoce, traduzido por uma média inferior do diâmetro máximo dos tumores e pelos graus da classificação de Hardy. Este facto pode ser devido, entre outros

factores, à circunstância de estes tumores não se acompanharem de síndromes endócrinas pelo que o seu diagnóstico se torna mais difícil, e ao facto de nas décadas de setenta e oitenta do século XX ter sido registado um número pequeno de casos (que muitas vezes não tinham referência às suas dimensões, nem estas foram passíveis de serem recuperadas). A média do seguimento e o número de casos perdidos para o seguimento foram idênticos para ambos os géneros.

1.2. Microadenomas clinicamente não funcionantes

Os tumores da hipófise clinicamente não funcionantes com dimensões inferiores ou iguais a 10 mm representaram 6,4% dos tumores, ocorrendo 80% no sexo feminino e 20% no sexo masculino. A média de idade do diagnóstico foi de 34,4 anos (16 a 70 anos). A maioria (86,7%) foi diagnosticada a partir da década de noventa, inclusive, facto este que estará relacionado com a disponibilidade dos meios complementares de diagnóstico. Nestes tumores, por não apresentarem sintomatologia clínica endocrinológica, o diagnóstico assenta em muito na Neurorradiologia. Salienta-se que após um seguimento médio de 6,6 anos (1 a 15 anos) nenhum progrediu para macroadenoma ou teve um aumento significativo das suas dimensões. Poder-se-á dizer que os tumores clinicamente não funcionantes com dimensões inferiores ou iguais a 10 mm não tiveram tendência a progredir, e como tal o seu prognóstico foi bom. Assim, parece possível inferir que não necessitam de medidas terapêuticas agressivas ou de seguimentos complexos, dispendiosos ou muito prolongados. No entanto refere-se que em outras séries, que na totalidade envolveram 144 microadenomas, 10% tiveram progressão tumoral, 6% regressão das suas dimensões e 84% permaneceram estáveis por um período de 8 anos de seguimento.⁴⁶³ Outros autores encontraram ainda uma progressão destes tumores, embora sem repercussões neuro-oftalmológicas, de cerca de 19% para um seguimento médio de 48 meses.⁶⁰⁴

1.3. Macroadenomas clinicamente não funcionantes

Os tumores clinicamente não funcionantes com dimensões superiores a 10 mm constituíram o principal objectivo do estudo e é sobre eles que se efectuou a verdadeira reflexão.

Apresentação clínica

Nesta população os macroadenomas ocorreram em 221 doentes, representando 93,6% destes tumores. A incidência por sexo (53,4% feminino vs. 46,6% masculino) e a média de idades do diagnóstico foram idênticas em ambos os géneros o que é sobreponível aos dados da literatura. No entanto em outras séries, como se apresenta seguidamente, há

ligeira preponderância do género masculino (56,7%) ao contrário do que foi observado nesta série. O diagnóstico efectuado com uma idade superior ou igual a 65 anos ocorreu em 35,3% dos doentes, de forma semelhante para os dois géneros. O facto de cerca de um terço ter sido diagnosticado nesta faixa etária, vem ao encontro do já referido relativamente ao facto da prevalência destes tumores aumentar com a idade mais avançada. A média da duração dos sintomas foi de dois anos a dois anos e meio, tendo sido muito variável, desde a sua ausência (diagnóstico incidental) até aproximadamente 20 anos. Os sintomas mais frequentes foram os resultantes do efeito de massa, o que é o esperado e descrito. Os neurológicos (aproximadamente 80%) e endocrinológicos (aproximadamente 50%) ocorreram de forma idêntica em ambos os géneros. Entre estes apenas as cefaleias se mostraram significativamente mais prevalentes no sexo feminino. Refere-se que a prevalência de cefaleias tipo *migraine* é de cerca de duas a três vezes superior na mulher relativamente ao homem com uma distribuição bimodal em ambos os géneros; um pico por volta dos 20 a 25 anos e outro pelos 50 anos.^{605,606} Por outro lado entre os sintomas endocrinológicos os compatíveis com insuficiência gonadal foram os mais frequentemente registados, tendo ocorrido em 34,4% dos doentes. Tal facto estará relacionado com a prevalência das insuficiências dos diferentes sectores da hipófise anterior, e com o facto de a insuficiência da somatotrofina ser de difícil avaliação e quantificação, e também nem sempre pesquisada e registada. Não foi observada diferença significativa destes sintomas em ambos os géneros.

Os sintomas neuro-oftalmológicos ocorreram em 60,2% mostrando-se mais prevalentes, embora de forma marginal, no sexo masculino (67,0% vs. 54,2%, $p=0,053$) e particularmente devido aos défices visuais (64,1% vs. 50,8%, $p=0,047$). As parésias foram idênticas. Estes achados poderão estar relacionados com a maior dimensão, extensão e invasão dos tumores no sexo masculino e com o facto da apoplexia/hemorragia ter sido semelhante nos dois géneros.

A apoplexia ocorreu em 10,9% dos doentes tendo sido a forma sub-clínica a mais frequente no sexo feminino, e a clínica no sexo masculino, embora sem diferença significativa. O diagnóstico incidental ocorreu em 14,5% dos doentes, 18,4% no sexo masculino e 11,0% no sexo feminino. Faz-se notar o facto de estes tumores, apesar de serem macroadenomas com sintomas prévios por efeitos compressivos, ainda serem diagnosticados de forma incidental (e por consequência, mais tardiamente). Estes resultados, embora sejam globalmente semelhantes aos da literatura, como se pode comprovar nas tabelas seguintes, revelam contudo uma maior prevalência o que poderá estar relacionado com um diagnóstico mais tardio.

Características clínicas em doentes com tumores da hipófise clinicamente não funcionantes

	Nomikos <i>et al</i> ⁴²⁶	Losa <i>et al</i> ⁴²⁷	Chang <i>et al</i> ⁴²⁸	Ferrante <i>et al</i> ⁴⁸⁵	Total
Nº de doentes	721	491	663	295	2170
Idade média	54,2±19	—	53 (mediana)	50,4±14,1	—
Género (M/F)	401/320	276/215	394/269	161/134	1232/938 (56,7%M)
Incidentaloma	57 (7,9%)	57 (11,6%)	49 (7,4%)	—	163/1875 (8,7%)
Cefaleias	70 (9,7%)	—	212 (32,0%)	122 (41,4%)	404/1679 (24,0%)
Défices visuais	222 (30,8%)	287/486 (59,1%)	327 (49,0%)	200 (67,8%)	1036/2170 (47,7%)
Oftalmoplegia	—	22 (4,5%)	26 (3,9%)	—	48/1154 (4,2%)
Sintomas hipopit.	345 (47,8%)	—	342 (51,6%)	118 (40,0%)	805/1679 (48,0%)
Hipopituitarismo	614 (85,0%)	—	—	183 (40,0%)	797/1016 (78,4%)
Hipogonadismo	512/659 (77,7%)	335/474 (70,7%)	—	128 (43,3%)	975/1261 (77,3%)
Hipoadrenalismo	230 (31,9%)	115/478 (24,1%)	—	77 (26,2%)	422/1494 (28,2%)
Hipotiroidismo	129/658 (19,6%)	116/462 (25,1%)	—	72 (24,5%)	317/1415 (22,4%)
Hiperprolact.	199 (27,6%)	251/462 (54,3%)	—	82 (27,6%)	532/1478 (35,9%)

Adaptado de Greenman Y, Stern N. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23:625–638.⁴⁰⁴

Na tabela seguinte apresenta-se de forma esquemática os resultados obtidos no presente trabalho em comparação com a totalidade dos estudos da tabela anterior.

Características clínicas em doentes com tumores da hipófise clinicamente não funcionantes

	Presente estudo	Total dos estudos anteriores ⁴⁰⁴
Nº de doentes	221	2170
Idade média	56,3±14,9	—
Género (M/F)	103/118 (46,6%M)	1232/938 (56,7%M)
Incidentaloma	32 (14,5%)	163/1875 (8,7%)
Cefaleias	127 (57,5%)	404/1679 (24,0%)
Défices visuais	133 (60,2%)	1036/2170 (47,7%)
Oftalmoplegia	16 (7,2%)	48/1154 (4,2%)
Sintomas de hipopituitarismo	107 (48,4%)	805/1679 (48,0%)
Hipogonadismo	133/189 (70,4%)	975/1261 (77,3%)
Hipoadrenalismo	45/180 (25,0%)	422/1494 (28,2%)
Hipotiroidismo	69/185 (37,3%)	317/1415 (22,4%)
Hiperprolactinemia	76/189 (40,2%)	532/1478 (35,9%)

Finalmente observou-se a existência de neoplasias associadas a estes tumores em 12,7% dos casos, idêntico em ambos os géneros. Não foi efectuada uma pesquisa exaustiva neste sentido, pelo que poderão estar subestimadas. Nos doentes não falecidos no pós-operatório imediato, estes tumores não foram directamente a causa da morte, pelo que a idade média da morte de 72,0 anos se deve mais às patologias associadas do que ao tumor hipofisário em si. Na correlação das variáveis clínicas, do tumor e do tratamento, com a morte no pós-operatório imediato verificou-se que a única com tendência a ser significativa foi o maior diâmetro do tumor (34,8±3,8 mm vs. 27,5±10,6 mm, $p=0,059$). Na totalidade dos doentes falecidos, a idade de diagnóstico mais avançada (66,5±54,9 anos vs. 54,9±15,0 anos, $p<0,001$), o maior diâmetro do tumor (35,0±13,5 mm vs. 26,9±9,8 mm, $p=0,023$) e graus mais elevados na classificação de Hardy ($p=0,029$) associaram-se positivamente à mortalidade. Igualmente, a presença de neoplasias associadas foi significativamente superior nos doentes falecidos *versus* nos não falecidos (34,6% vs. 9,7%,

$p < 0,001$). Poder-se-á inferir que a mortalidade no pós-operatório ocorreu particularmente nos tumores de maiores dimensões. Na generalidade, a mortalidade correlacionou-se com factores inerentes ao doente (nomeadamente idade mais avançada de diagnóstico e a presença de neoplasias associadas), e a factores inerentes aos próprios tumores (maiores dimensões e mais invasivos). As insuficiências hipofisárias e o tipo de tratamento não diferiram entre os doentes falecidos e os vivos.

Características dos tumores

Os tumores no sexo masculino tiveram significativamente maiores dimensões, maior extensão supra-selar e invasão do seio esfenoidal. Embora utilizando a classificação de Hardy não se tenha observado diferença significativa entre os géneros, poder-se-á afirmar que os tumores no sexo masculino eram de maior volume. A invasibilidade foi idêntica, com excepção da invasão do seio esfenoidal, que foi superior no sexo masculino. A presença de áreas quísticas, de necrose e de hemorragia, bem como o estudo imunohistoquímico, foram semelhantes para ambos os géneros.

Avaliação pré e pós-operatórias: função hipofisária e estudo oftalmológico

Na apresentação e antes de qualquer intervenção terapêutica, as insuficiências ante-hipofisárias foram todas significativamente mais frequentes no sexo masculino do que no feminino, e de elevada percentagem. A proporção foi concordante com a conhecida progressão das insuficiências hipofisárias e com o descrito atrás em outras séries. O défice de IGF1 foi igualmente superior no sexo masculino. Estes resultados estão relacionados e concordantes com a maior dimensão e extensão supra-selar dos tumores no género masculino. A prolactinemia média e a hiperprolactinemia foram significativamente mais elevadas no sexo feminino, o que se poderá dever ao próprio género e não apenas à dimensão do tumor. Salienta-se que houve uma correlação positiva entre o maior diâmetro do tumor e os níveis séricos de prolactina em ambos os sexos. O mesmo aconteceu com os défices visuais.

Após as intervenções terapêuticas os défices da função ante-hipofisária mantiveram-se elevados, em ambos os géneros, mas já não havendo diferença significativa para os défices da função tiroideia e cortico supra-renal. Isto deveu-se a um maior agravamento destes no sexo feminino, e não à sua recuperação no sexo masculino. A prolactinemia média e a hiperprolactinemia mantiveram-se significativamente mais elevadas no sexo feminino, mas só no sexo masculino se observou uma correlação positiva com o maior diâmetro do tumor. A insuficiência ante-hipofisária global ocorreu em 31,6% (29,4% no sexo feminino e 34,1% no masculino) dos doentes e a diabetes insípida permanente em 7,1% (7,8% no sexo feminino e 6,4% no masculino), ambas idênticas para ambos os géneros.

Relativamente aos défices visuais, deixaram de ser significativamente superiores no sexo masculino, por melhoria e recuperação em ambos os géneros, particularmente no masculino. As parésias tiveram uma recuperação total ou praticamente total.

Quando foram analisadas estas variáveis por género e apenas nos doentes com ambos os estudos, antes e após tratamento, verificou-se um agravamento significativo dos défices do sector tiroideu, cortico supra-renal e da IGF1, apenas no sexo feminino. De notar que os défices de somatotrofina e gonadal já eram elevados no sexo feminino pelo que o seu agravamento foi menos acentuado. No sexo masculino estes défices, já elevados, mantiveram-se. A prolactinemia média e a hiperprolactinemia diminuíram significativamente em ambos os géneros. Os défices visuais reduziram-se significativamente em ambos os géneros. Assim sendo, poder-se-á afirmar que quer o tratamento cirúrgico quer o radioterapêutico se mostraram incapazes de melhorar a função hipofisária, mas foram eficazes na melhoria dos défices neuro-oftalmológicos.

Tratamento cirúrgico: tipo, resultados e complicações

A maioria dos doentes (71,0%) foi submetida a uma intervenção cirúrgica, o que ocorreu de forma semelhante para ambos os géneros. No sexo masculino o número de doentes com mais de duas cirurgias foi significativamente superior. A via preferencial foi a via transesfenoidal (84,8%), idêntica em ambos os géneros. Embora não significativo, realça-se um maior número de cirurgias transcranianas no sexo masculino, o que poderá estar relacionado com as maiores dimensões dos tumores e o longo período em que a análise incidiu. O intervalo entre a primeira e a segunda cirurgia foi muito variável, de 2 meses a 23 anos, o que evidencia a necessidade de um seguimento prolongado, para a vida, destes doentes. O tratamento cirúrgico não foi isento de efeitos secundários: estes ocorreram em 25,5% dos doentes, o que está dentro dos limites superiores referidos na literatura (6,5%-29%).⁶⁰⁷ A mortalidade foi importante, de 3,5%, sendo referido em outras séries um intervalo de 0,27% a 3%;⁶⁰⁷ os efeitos adversos severos situaram-se em 11% e os efeitos adversos menores em 19,5%.

Radioterapia e complicações

A radioterapia foi efectuada em 23 (10,4%) dos doentes, percentagem idêntica para ambos os géneros. Foi sempre instituída após a cirurgia, quer como tratamento coadjuvante da primeira cirurgia, quer no seguimento, por progressão do tumor. O tempo médio entre a cirurgia e a radioterapia foi de cerca de um ano e meio, variando de um mês a sete anos. A radioterapia foi instituída mais precocemente no sexo feminino do que no sexo masculino ($p=0,011$). Os efeitos adversos ocorreram em cerca de cinquenta por cento dos doentes: em 45,5% no sexo feminino e em 58,3% no sexo masculino. Salienta-se a elevada percentagem de hipopituitarismo em ambos os géneros, 54,5% e 50,0%, percentagens semelhantes ao descrito por outros autores. As alterações cognitivas, de difícil avaliação e quantificação, foram registadas em cerca de quarenta por cento dos doentes. Finalmente foram diagnosticados 2 meningiomas, o que correspondeu a 8,7% dos doentes irradiados.

1.4. Macroadenomas clinicamente não funcionantes: progressão ou recorrência e factores preditivos

A avaliação da progressão ou recorrência dos tumores só foi possível em 194 doentes. Após um seguimento médio de 8,7 anos (1 a 40 anos), 36,2% dos doentes tiveram progressão do seu tumor com necessidade de uma segunda intervenção terapêutica. Esta taxa foi idêntica em ambos os géneros. Durante o seguimento, o tempo médio de progressão ou de recorrência foi de 3,9 anos. A idade média do diagnóstico foi idêntica nos doentes com e sem progressão. Contudo, quando se analisaram os doentes diagnosticados com uma idade igual ou superior a 65 anos, verificou-se que nesta faixa etária a incidência de progressão foi significativamente maior. Ao tentar analisar os eventuais factores associados a este aumento de progressão ou recorrência, verificou-se que as dimensões e a remoção aparentemente total do tumor eram idênticas. Já a invasão do seio cavernoso foi significativamente mais prevalente nos doentes mais jovens, o que parece estar em contradição com a progressão da doença nos mais idosos. Contudo, nestes últimos, factores associados a menor progressão da doença, como a apoplexia (dois casos) e a radioterapia (um caso), foram significativamente inferiores. Nos doentes com progressão do tumor, a mortalidade foi de cerca do dobro (68,8% vs. 31,3%, $p=0,020$). Neste grupo também se observou, nomeadamente nas curvas de Kaplan-Meier, que a taxa de progressão ou recorrência foi maior nos doentes com idade superior ou igual a 65 anos e com tumores de maiores dimensões, mais invasivos e com graus mais elevados na classificação de Hardy. Uma vez que o género, a idade média e a presença de neoplasias associadas foram semelhantes, poder-se-á inferir que a mortalidade significativamente associada à progressão ou recorrência da doença se deveu, sobretudo, ao subgrupo de doentes com idade superior ou igual a 65 anos e à maior agressividade dos tumores e das suas consequências (maior agressividade da cirurgia e da radioterapia e efeitos adversos associados), incluindo a mortalidade no pós-operatório imediato.

Apresentação clínica

Como factores clínicos de apresentação com potencial valor indicativo de progressão ou recorrência, apenas se encontrou uma associação significativa com a duração da sintomatologia, e por conseguinte um provável diagnóstico mais tardio, e com os sintomas neuro-oftalmológicos. Os défices visuais foram cerca de 2,7 vezes superiores nos doentes com progressão da doença.

Características dos tumores

Como factores preditivos de um comportamento biológico mais agressivo, associados de forma significativa à progressão ou recorrência da doença, estiveram: a maior dimensão dos tumores, graus mais elevados na classificação de Hardy, a extensão infra e para-selar e invasão do seio cavernoso, do pavimento/óssea e de ambos, seio cavernoso e pavimento/óssea. Estas conferiram um risco de cerca de 2 a 2,5 vezes superior de

progressão à excepção da invasão combinada do seio cavernoso e pavimento/óssea que quase que conferiu um risco de 5 vezes superior. Pela análise das curvas de ROC para o maior diâmetro dos tumores, encontrou-se um valor de corte de cerca de 20 mm como factor de risco para a progressão ou recorrência. É interessante referir que alguns autores⁴⁸² consideram que a remoção aparentemente total do tumor só é possível em aproximadamente 20% dos casos com tumores de diâmetro máximo superior a 20 mm. Como a progressão ou recorrência da doença se mostrou significativamente dependente do tipo de remoção cirúrgica, total *versus* parcial, torna-se compreensível aquele valor de corte encontrado pelas curvas de ROC, como muito significativo, e que é perfeitamente concordante com esses dados da literatura. A ocorrência de apoplexia, clínica ou sub-clínica, esteve associada a uma menor progressão da doença, em cerca de três (3,3) vezes. O tipo imunohistoquímico do tumor mostrou uma tendência para uma maior agressividade nos gonadotrofinomas ($p=0,085$) que só se mostrou significativa quando projectada nas curvas de Kaplan-Meier. O índice de proliferação celular, MIB-1/Ki-67, só efectuado em 53 doentes e de forma semi-quantitativa, não permitiu retirar conclusões. Constatou-se apenas que foram diagnosticados três adenomas atípicos, todos em tumores não secretores, dois nos doentes sem progressão ou recorrência e um com progressão ou recorrência.

Avaliação pré e pós-operatórias: função hipofisária e estudo oftalmológico

Salienta-se a elevada percentagem de insuficiências ante-hipofisárias observadas na globalidade dos doentes antes e após o tratamento. Contudo os doentes que tiveram progressão da doença foram os que apresentaram maior taxa de insuficiências. Faz-se notar a elevada percentagem de insuficiências do sector tiroideu e cortico supra-renal, os habitualmente referidos como menos atingidos. A prolactinemia média e a hiperprolactinemia foram significativamente mais frequentes nos doentes com progressão do tumor e estiveram correlacionadas com o seu maior diâmetro. Os défices visuais antes e após tratamento foram igualmente mais prevalentes, e de forma significativa, nos doentes com progressão da doença. Estes défices estão concordantes com as maiores dimensões, extensão e invasão dos tumores.

A análise da função hipofisária nos doentes com ambas as avaliações, antes e após tratamento, voltou a mostrar uma elevada percentagem de insuficiências (superior a cinquenta por cento) quer nos doentes com quer nos sem progressão da doença. Salienta-se que após o tratamento, as insuficiências foram ainda mais prevalentes nos doentes com progressão dos tumores, reflectindo provavelmente a maior agressividade dos tumores e dos consequentes tratamentos efectuados. Realça-se, de novo, o aumento significativo das insuficiências tiroideia e cortico supra-renal. As insuficiências da somatotrofina e gonadal já eram previamente elevadas. Quer a média da prolactinemia, quer a hiperprolactinemia eram significativamente superiores antes do tratamento em ambos os grupos. Globalmente, o tratamento instituído melhorou de forma significativa os défices visuais em ambos os grupos. No entanto refere-se uma percentagem mais elevada de

persistência de défices visuais nos doentes com progressão dos tumores, o que poderá igualmente reflectir uma maior agressividade destes e do seu tratamento.

Tratamento cirúrgico e radioterapia

Nos doentes em que houve progressão da doença as cirurgias transcranianas foram mais frequentes. A remoção aparentemente total do tumor, aquando da primeira cirurgia foi 3,6 vezes superior nos doentes sem progressão da doença. A radioterapia de consolidação após a primeira cirurgia foi cerca de 10 vezes mais frequente nos doentes em que não houve progressão da doença. Refere-se que neste tipo de tumores a radioterapia após a cirurgia claramente diminui a progressão ou recorrência. Os resultados são semelhantes para vários autores. Segundo Gittoes *et al.*, o tempo de progressão livre de doença foi de 94% ao fim de cinco anos e dez anos em doentes que receberam radioterapia, e de 82% aos 5 anos e 59% aos dez anos nos não irradiados.⁶⁰⁸ Segundo outros autores, em que 65% dos doentes não irradiados foram seguidos por um período médio de 76 meses (12 a 173 meses) a progressão ocorreu em 32%. O tempo médio para a detecção da progressão foi de 5,4 anos (2 a 14 anos). A sobrevivência livre de progressão ou recorrência foi de 82% aos 5 anos e de 56% aos 10 anos, semelhantes à série anterior.⁶⁰⁹ Neste trabalho a progressão da doença ocorreu em 36,2% dos doentes com um tempo médio de recorrência de 3,4 anos. Uma vez que a percentagem de doentes irradiados após a cirurgia foi mínima, poderemos dizer que a taxa de progressão ou recorrência neste estudo está dentro do previsível, e que a radioterapia se mostrou igualmente benéfica na redução dessa progressão.

2. Estudo molecular

A investigação molecular foi dirigida para a interacção entre os genes e o ambiente pelo estudo de genes que codificam enzimas de metabolização de substâncias genotóxicas (*CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1*) e dos genótipos que pudessem conferir maior susceptibilidade para essas substâncias. Estudou-se ainda o gene *AIP* que pode igualmente conferir susceptibilidade para os tumores da hipófise. É um gene envolvido em alguns quadros familiares mas cujos mecanismos de acção não estão perfeitamente esclarecidos. Pode comportar-se como um gene de supressão tumoral, inibidor da apoptose e funcionar como um regulador da resposta celular à dioxina, um genotóxico, pela ligação ao seu receptor AhR. Quando mutado, pode ainda condicionar uma desregulação da sinalização pelo AMPc.⁶¹⁰

2.1. Genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1*

Em estudos epidemiológicos, os polimorfismos genéticos envolvidos no metabolismo de genotóxicos mostraram-se relevantes no risco individual de formação tumoral.^{611,612} Esta relevância parece ser devida às diferentes capacidades das enzimas polimórficas para activar ou desactivar diversos carcinogêneos e mutagêneos. Vários foram os tumores estudados, nomeadamente os do pulmão, cabeça e pescoço, aparelho digestivo, mama, bexiga, próstata, pele, tiróide e neoplasias hematológicas.^{6,613,614,615,616,617,618,619,620} No entanto dever-se-á referir que existem alguns dados controversos em relação aos resultados obtidos.

Neste trabalho foram descritas as frequências genotípicas dos genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1* em 235 doentes com diferentes tumores da hipófise no sentido de determinar se algum genótipo, em particular, poderia estar associado a uma maior susceptibilidade para estes tumores ou para algum dos seus subtipos histológicos. O alelo metabolizador activo (*CYP2D6*1*) foi encontrado em uma frequência significativamente mais elevada no grupo dos doentes. O significado funcional deste achado permanece por esclarecer. Os mecanismos propostos para o aumento de susceptibilidade têm incluído a activação metabólica de carcinogêneos químicos desconhecidos ou uma ligação a outro eventual gene indutor de formação tumoral.^{10,12,621,622} A frequência da homozigotia *CYP2D6*4* no grupo dos doentes foi de 2,6%, percentagem esta inferior ao que tem sido descrito na população caucasiana de 5% a 10%.^{613,623,624,625,626} Relativamente aos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* não foi encontrada qualquer associação significativa. As frequências dos genótipos nulos *GSTM1* foram de 54,5% nos doentes e de 57% no grupo de controlo e *GSTT1* de 17,5% e 18,4%, respectivamente. Estas frequências foram semelhantes ao descrito para outras populações europeias, de aproximadamente 50% e 20%, respectivamente.^{613,623,626}

Quando os adenomas foram divididos de acordo com o seu tipo histológico não se observou qualquer diferença significativa entre os diferentes subgrupos e o grupo de controlo para os diferentes polimorfismos dos três genes analisados.

Em resumo, estes resultados sugerem que os polimorfismos do gene *CYP2D6* podem estar, eventualmente, associados a uma maior susceptibilidade para os tumores da hipófise relativamente ao grupo de controlo. Os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* não parecem estar associados a um risco para estes tumores. No entanto seriam necessários mais estudos para se verificar a verdadeira relevância destes achados e analisar o seu efeito de acordo com o tipo histológico do adenoma.

2.2. Gene *AIP*

A maioria (95%) dos tumores da hipófise ocorre de forma esporádica.⁶²⁷ Tem sido considerado que têm uma origem clonal, pela expansão de alterações moleculares em uma única célula somática.⁶²⁸ Contudo são conhecidas situações que estão relacionadas

com defeitos genéticos que predis põem para o desenvolvimento de um tumor da hipófise, habitualmente em um contexto familiar (5%). Os tumores hipofisários isolados familiares têm sido cada vez mais referidos na literatura. Mutações germinais do gene *AIP* foram descritas em aproximadamente 15% das famílias e em 50% das famílias homogêneas para somatotrofinomas.⁶²⁷ Outro mecanismo interessante que poderia associar este gene à predisposição para o desenvolvimento de tumores da hipófise é o seu papel na regulação de enzimas xenobióticas através da sua ligação ao receptor aril hidrocarbono, ao qual se liga a dioxina. Contudo, como anteriormente referido, não se conhece o seu papel nesta interacção da predisposição genética com o ambiente.

Neste trabalho os resultados do estudo molecular do gene *AIP* indicaram que mutações germinais ocultas no gene *AIP* não estiveram presentes em doentes com somatotrofinomas ou mamossomatotrofinomas aparentemente esporádicos. Foram analisados doentes diagnosticados em idades jovens que, hipoteticamente, teriam uma maior probabilidade de serem portadores de mutações germinais ocultas. A ausência de mutações neste grupo de doentes sugere que as mutações germinais no gene *AIP* provavelmente não têm um papel relevante na patogénese dos somatotrofinomas esporádicos. Observações semelhantes foram descritas por outros autores que encontraram uma frequência destas mutações de 0% a 2,8% (em média 2%) e que estudaram um maior número de doentes, embora em populações mais heterogêneas.^{283,629,630,631,632} Foram estudados doentes com um espectro mais vasto de idades e nos diferentes tipos histológicos dos tumores da hipófise. No entanto alguns autores advogam a sua pesquisa em tumores diagnosticados em idades jovens e com maior agressividade, embora o papel do seu rastreio ainda esteja por definir. Estão a decorrer estudos em doentes com tumores esporádicos de apresentação clínica em idades precoces (inferiores a 30 anos), e em alguns deles encontraram-se mutações do gene *AIP* com uma frequência de 17%.⁶³³

A detecção de mutações somáticas não foi relevante, segundo a maioria dos autores, pelo que a sua pesquisa nesta amostra não se considerou ser pertinente. Já a avaliação da expressão da proteína *AIP* era um objectivo mas, por falta de recursos humanos e técnicos não foi investigada. Verificou-se que a sua sobre-expressão em linhas celulares reduziu a proliferação celular,²⁶⁵ o que é consistente com o seu papel de gene de supressão tumoral. Até ao momento foram apenas publicados dois trabalhos em que esta expressão foi investigada. Um sobre a expressão da proteína *AIP* nos diferentes tipos de tumores, e que encontrou uma expressão baixa da proteína nos somatotrofinomas invasivos,⁶³⁴ e um outro muito recente que encontrou variações na expressão da proteína *AIP* correlacionada com a agressividade de alguns tumores. Observaram uma sub-expressão desta proteína nos somatotrofinomas, que estava associada a maior agressividade dos tumores, e uma sobre-expressão nos tumores clinicamente não funcionantes, associada a um maior índice de proliferação celular mas não a maior agressividade do tumor.⁶⁰³ Assim sendo, infere-se que mais estudos serão necessários para definir qual ou quais os mecanismos de acção e papel do gene *AIP* nos tumores hipofisários aparentemente esporádicos (e também nos familiares), de forma a permitir conhecer melhor a sua etiopatogenia, comportamento biológico e a mais adequada opção terapêutica.

VI. CONCLUSÕES

1. Estudo clínico

O estudo clínico de 236 tumores da hipófise clinicamente não funcionantes diagnosticados durante um período de 40 anos e com seguimento no Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo dos HUC, EPE permitiu a análise de 221 macroadenomas e dos factores clínicos envolvidos na sua apresentação e no seu comportamento biológico. A incidência por géneros foi idêntica com uma idade média de diagnóstico semelhante. A sintomatologia clínica de efeito de massa foi similar para ambos, à excepção das cefaleias que foram mais frequentes no sexo feminino e dos défices visuais no sexo masculino. Neste género os tumores eram de maiores dimensões e com maior extensão supra-selar o que poderá justificar os défices visuais.

Na avaliação prévia a qualquer abordagem terapêutica, o estudo hormonal e oftalmológico revelaram, no sexo masculino, deficiências significativamente superiores de todos os sectores hipofisários e dos défices visuais, acuidade visual e defeitos campimétricos. Correlacionaram-se estes achados igualmente com a maior dimensão do tumor.

Após o tratamento mantiveram-se importantes deficiências hormonais, com atenuação da diferença entre os géneros por agravamento no sexo feminino. Os défices visuais passaram a ser menores e semelhantes em ambos os géneros por maior recuperação no sexo masculino. Quando se fez a análise das deficiências hipofisárias e défices visuais antes e após o tratamento observou-se uma não recuperação das deficiências hipofisárias, inclusive, com agravamento significativo dos sectores tiroideu e cortico supra-renal no sexo feminino. No sexo masculino não houve modificações significativas. Os défices visuais melhoraram significativamente, em ambos os géneros, com o tratamento. Poder-se-á assim inferir que a cirurgia e a radioterapia nos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes não são eficazes na reversão das deficiências ante-hipofisárias, mas que se revelam benéficas para a recuperação dos défices visuais.

A maioria dos doentes (71%) foi submetido a uma cirurgia e o maior número de cirurgias por doente foi observado no sexo masculino. A remoção aparentemente total na primeira cirurgia foi de 73,5%, idêntica em ambos os géneros, e em 25,5% houve complicações, nomeadamente mortalidade no pós-operatório de 3,5%. A radioterapia foi instituída em 10,4% dos doentes, idêntico em ambos os géneros, mas no sexo feminino foi de forma mais precoce, após a primeira ou segunda cirurgia. Os efeitos adversos dominantes foram o hipopituitarismo (52,4%) e a referência a alterações do tipo cognitivo e emocional (39,1%). Foram diagnosticados dois meningiomas, um no sexo feminino e outro no sexo masculino.

A progressão ou recorrência do tumor ocorreu em 41,2% dos macroadenomas, após um tempo médio de progressão de 3,9 anos (3 meses a 24 anos), idênticas em ambos os géneros. Indicadores clínicos dessa progressão ou recorrência foram: maior duração dos sintomas; maior frequência de sintomas neuro-oftalmológicos; maior dimensão do tumor; diâmetro máximo do tumor superior a 20 mm; extensão infra-selar e para-selar do tumor; invasão do pavimento/óssea, do seio cavernoso e da associação do pavimento/óssea ao seio cavernoso do tumor; tipo imunohistoquímico de gonadotrofinoma e maiores

deficiências da função ante-hipofisária. Como factores de menor progressão ou recorrência do tumor foram encontrados: apoplexia, clínica ou sub-clínica; remoção aparentemente total do tumor na primeira cirurgia e radioterapia coadjuvante da cirurgia. De todos estes factores os que se revelaram isoladamente mais determinantes foram o diâmetro máximo do tumor e o valor de corte para esse diâmetro superior a 20 mm, e a remoção aparentemente completa do tumor aquando da primeira cirurgia.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho demonstraram que as dimensões, a extensão e invasibilidade dos tumores estão associadas ao prognóstico de recorrência. O valor de corte para o diâmetro máximo do tumor em 20 mm mostrou-se como um factor independente e dos mais importantes para esse prognóstico. A remoção cirúrgica aparentemente completa dos tumores, aquando da primeira cirurgia, tem um papel crucial no prognóstico tendo sido possível em mais de setenta por cento dos casos. A cirurgia, actualmente, é relativamente segura e é seguida, frequentemente da melhoria e da recuperação dos sintomas e dos défices visuais, embora a melhoria da função hipofisária seja menos provável ou mesmo improvável. A radioterapia revelou-se o tratamento coadjuvante mais eficaz na prevenção da progressão de resíduos tumorais ou de recorrência tumoral. No entanto, o benefício da radioterapia deverá ser ponderado de acordo com os seus potenciais efeitos adversos. Assim sendo, diversos factores, tais como a idade, a função hipofisária, e tipo de radioterapia, devem ser considerados na subsequente orientação dos doentes para este tipo de tratamento. Para além destes aspectos dever-se-á igualmente referir que o tempo médio de progressão ou de recorrência foi de cerca de quatro anos o que permite tomar decisões diferidas sem agravamento do risco para o doente. Finalmente refere-se que nenhum dos microadenomas teve progressão das suas dimensões, pelo que a cirurgia não é uma indicação de primeira linha e a atitude de observação parece ser a melhor opção. Assim, torna-se possível um seguimento e eventuais atitudes terapêuticas mais conservadoras e menos exaustivas neste tipo de tumores.

2. Estudo molecular

O estudo molecular dos polimorfismos dos genes *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1* vieram sugerir que polimorfismos do gene *CYP2D6* podem estar associados a uma maior susceptibilidade para os tumores da hipófise nesta população europeia caucasiana. No entanto seriam necessários mais estudos para se verificar a verdadeira relevância deste achado e analisar o seu efeito de acordo com o tipo histológico do tumor.

Apesar dos enormes progressos que tem havido na compreensão das bases moleculares das síndromes familiares associadas a tumores hipofisários, tais como a neoplasia endócrina múltipla tipo 1, o complexo de Carney e os tumores da hipófise familiares isolados, a patogenia dos tumores aparentemente esporádicos permanece largamente desconhecida. Na sua quase totalidade são tumores benignos pelo que a identificação de mutações em oncogenes e genes de supressão tumoral é menos provável. O que habitualmente surge são expressões anormais de genes envolvidos nos diferentes passos

da função celular. Os resultados obtidos indicam que mutações germinais do gene *AIP* não estarão associadas aos tumores da hipófise esporádicos neste grupo europeu de doentes. Foram estudados doentes jovens em que a probabilidade teórica de ser portador de uma mutação oculta seria maior. A sua ausência sugere que as mutações germinais do gene *AIP* não terão um papel relevante na patogenia dos somatotrofinomas hipofisários esporádicos. Contudo, a baixa frequência das mutações ocultas do gene *AIP* requer estudos de maior dimensão.

Para concluir, poder-se-á inferir que uma predisposição genética, induzida por polimorfismos ou mutações de genes envolvidos na codificação de enzimas de metabolização de genotóxicos, associada a factores ambientais, aparentemente não parece ter um papel crucial no desenvolvimento destes tumores. Serão necessários estudos adicionais para identificar outros factores genéticos subjacentes ao desenvolvimento dos tumores da hipófise de forma a se poder proceder a um diagnóstico mais precoce, à identificação do seu comportamento biológico e a uma abordagem terapêutica mais correcta e dirigida.

3. Correlação dos estudos clínico e molecular

Os resultados deste trabalho mostraram que, de momento, os factores clínicos se revelaram mais determinantes na previsão do prognóstico dos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes do que os factores moleculares. O estudo molecular não evidenciou uma associação clara quer com a predisposição para os diferentes tipos de tumores da hipófise, quer com o valor preditivo para um prognóstico de maior agressividade. No entanto refere-se que este estudo foi sobretudo clínico e mais restrito nos aspectos moleculares, uma vez que muitos outros factores não foram investigados, motivo pelo qual não permite que sejam retiradas conclusões seguras. Contudo, realça-se que apesar de muitos outros trabalhos estarem em desenvolvimento nesta área, ainda permanecem obscuros os factores envolvidos quer na etiopatogenia quer no comportamento biológico dos tumores da hipófise com consequências particularmente importantes na orientação do tratamento.

VII. RELEVÂNCIA DO TRABALHO REALIZADO

A investigação proposta enquadrou-se no âmbito de uma colaboração inter-institucional que visou uma abordagem multidisciplinar ao problema da etiopatogenia e do comportamento biológico dos tumores da hipófise, com uma base fundamentalmente clínica. Ao concluí-lo admite-se que se contribuiu para complementar outros estudos, através da análise dos diferentes aspectos clínicos envolvidos nos tumores da hipófise clinicamente não funcionantes e no seu comportamento biológico com implicações no tipo de tratamento a instituir. Os resultados obtidos reforçaram que os tumores de maiores dimensões, maior extensão e invasão são aqueles que maior probabilidade têm de ter um comportamento biológico progressivo ou recorrente. Poder-se-á assim inferir que para melhorar o seu prognóstico e complicações seria desejável a realização do diagnóstico numa fase mais precoce, em que o tumor teria menores dimensões, menor extensão e invasibilidade. Tal não se observou neste grupo de doentes, ao longo das últimas duas décadas. Faz-se notar a escassez de sintomas que muitas vezes está associada a este tipo de tumores sem expressão hormonal evidente, dificultando, por conseguinte, o diagnóstico. Contudo, dever-se-ão valorizar de forma mais apurada os sintomas neurológicos, neuro-oftalmológicos e os endocrinológicos decorrentes do compromisso das estruturas envolventes e da hipófise normal, já que as suas prevalências foram claramente elevadas. Por outro lado verificou-se que uma terapêutica cirúrgica eficaz, com remoção aparentemente total do tumor, foi o factor mais determinante bem como a complementação com radioterapia, em casos seleccionados, na melhoria do prognóstico. Assim sendo, conclui-se que é da maior relevância a diferenciação de uma equipa neurocirúrgica nesta área de forma a otimizar o sucesso terapêutico e minimizar os efeitos indesejáveis.

O estudo molecular, embora tenha avaliado factores de susceptibilidade para os diferentes tipos de tumores da hipófise em uma população europeia caucasiana, não permitiu retirar conclusões seguras e relevantes para o seguimento e orientação destes doentes. É interessante referir que foram avaliados genes envolvidos na metabolização de genotóxicos, *CYP2D6*, *GSTM1* e *GSTT1* e o gene *AIP*. Embora a fisiopatologia do gene *AIP* não seja clara, sabe-se que o receptor aril hidrocarbono é activado por tóxicos como a dioxina e que controla vias metabólicas implicadas na metabolização de genotóxicos e na proliferação celular. Assim sendo, poder-se-á especular se a susceptibilidade conferida pelos genes estudados para factores genotóxicos não estará envolvida na etiopatogenia destes tumores, uma vez que não foram encontradas alterações relevantes desses genes e envolvidos naquelas vias.

Os resultados obtidos contribuíram assim para identificar sobretudo factores clínicos que influenciam o comportamento biológico destes tumores, a resposta à terapêutica e a sua evolução bem como para identificar factores biológicos de agravamento do prognóstico de modo a permitir uma terapêutica mais individualizada.

Finalmente acredita-se que a realização deste trabalho pode levar ao incentivo e à continuação de futuros estudos, do âmbito da biologia molecular, translacionais e clínicos nos tumores da hipófise e que têm como finalidade última contribuir para o avanço do conhecimento nesta área da ciência.

Por fim é um desafio muito pessoal tentar perceber e enquadrar o conceito holístico da neuroendocrinologia, desde o seu conhecimento ancestral até ao século XXI, no âmbito do conhecimento molecular, pré-clínico e clínico e da patologia tumoral associada, de forma a percebê-la melhor e assim poder contribuir para preservar a saúde física, psíquica e mental do ser humano, que em algum momento é afectado pela doença.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Barkan AL. Preface. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2008;37:xvii-xviii.
- ² Daly AF, Tichomirowa MA, Beckers A. The epidemiology and genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23:543-554.
- ³ Greenspan FS, Gardner DG. *Basic & Clinical Endocrinology: Eighth Edition (Lange Medical Books)*, MacGrawHill 2007.
- ⁴ Toni R. The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. *J Endocrinol Invest* 2004;27(Suppl to no. 6):35-47.
- ⁵ Pearse AGE. The diffuse neuroendocrine systems: peptides, amines, placodes and the APUD theory. *Prog Brain Res* 1986;68:25-31.
- ⁶ DeLellis RA, Tischler AS, Wolfe HJ. Multidirectional differentiation in neuroendocrine neoplasms. *J Histochem Cytochem* 1984;32:899-904.
- ⁷ Andrew A. The APUD concept: where has it led us? *Br Med Bull* 1982;38:221-225.
- ⁸ Hakanson R, Sundler F. The design of the neuroendocrine system: A unifying concept and its consequences. *Trends Pharmacol Sci* 1983;4:41-44.
- ⁹ Baylis BW, Tranmer BJ, Ohtaki M. Central and autonomic nervous system links to the APUD system (and their APUDomas). *Sem Surg Oncol* 1993;9:387-393.
- ¹⁰ Demeure MJ. Physiology of the APUD system. *Sem Surg Oncol* 1993;9:362-367.
- ¹¹ Van Wyk JJ. Remembrance of our founders: will growth factors, oncogenes, cytokines and gastrointestinal hormones return us to our beginnings? *Endocrinology* 1992;130:3-5.
- ¹² Ballieux RE, Heijnen CJ. Brain and immune system: a oneway conversation or a genuine dialogue? *Prog Brain Res* 1987;72:71-77.
- ¹³ Reichlin S. Neuroendocrine-immune interactions. *N Engl J Med* 1993;329:1246-1253.
- ¹⁴ Brown-Sequard CD, D'Arsonval A. Sur les extraits retirés des glandes et d'autres parties de l'organisme. *Arch Physiol Norm Pathol* 1891;Series 5 III:491-506.
- ¹⁵ Schafer E. Address in physiology of internal secretions. *Lancet* 1895;2:321-324.
- ¹⁶ Harris GW. Neural control of the pituitary gland. *Physiol Rev* 1948;28:139-179.
- ¹⁷ Fujita T. Present status of the paraneuron concept. *Arch Histol Cytol* 1989;52:1-8.
- ¹⁸ Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Phys Rev* 1989;69:1-82.
- ¹⁹ Halasz B. Neuroendocrinology in 1992. *Neuroendocrinology* 1993;57:1196-1207.
- ²⁰ Medvei VC. The history of clinical endocrinology. New York: Parthenon Publishing 1993, 341-342.
- ²¹ Grube D, Bargsten G, Cetin Y, Yoshie S. Chromogranins in the mammalian GEP endocrine cells: their distribution and interrelation with co-stored amines and peptides. *Arch Histol Cytol* 1989;52:291-298.
- ²² Ahren B. Regulatory peptides in the thyroid gland - a review of their localization and function. *Acta Endocrinol* 1991;124:225-232.
- ²³ Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 1991;12:45-77.
- ²⁴ Saez JM. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocr Rev* 1994;15:574-626.
- ²⁵ Sealey JE, Quimby FW, Itskovitz J, Rubattu S. The ovarian renin-angiotensin system. *Front Neuroendocrinol* 1990;11:213-37.
- ²⁶ Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev* 2000;21:412-43.
- ²⁷ Wurtman RJ, Anton-Tay F. The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Rec Progr Horm Res* 1969;25:493-522.
- ²⁸ Martin JB, Reichlin S. *Clinical Endocrinology*. Philadelphia: FA Davis. 1987, 201-231.
- ²⁹ Toni R. Ancient views on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis: an historical and epistemological perspective. *Pituitary* 2000;3:83-95.
- ³⁰ Van Lysebetyh A. *Tantra - Le Culte de la Féminité. L'autre regard sur la vie et le sexe*. Fribourge-Lausanne: Edivos 1988.
- ³¹ Giorgi PP, Pasini GF. *Anothomia di Mondino de' Liuzzi da Bologna, XIV secolo*. Bologna: Istituto per la Storia dell'Università di Bologna, Opere dei Maestri, vol V, 1992.
- ³² Gerendai I, Halasz B. Participation of a pure neuronal mechanism in the control of gonadal functions. *Andrologia* 1981;13:275-282.
- ³³ Stern DL, Emlen DJ. The developmental basis for allometry in insects. *Development* 1999;126:1091-1101.

- ³⁴ Day SJ, Lawrence PA. Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* 2000;127:2977-2987.
- ³⁵ Edelman GM. *Topobiology, an introduction to molecular embryology*. New York: Basic Books Inc. 1988.
- ³⁶ Cappabianca P, Divitiis E. Back to the Egyptians: neurosurgery via the nose. *Neurosurg Rev* 2007;30:1-7.
- ³⁷ Toni R, Malaguti A, Benfenati F, Martini L. The human hypothalamus: a morpho-functional perspective. *J Endocrinol Invest* 2004;27(Suppl to no. 6);73-94.
- ³⁸ Suk I, Tamargo RJ. Concealed neuroanatomy in Michelangelo's *Separation of Light from Darkness* in the Sistine Chapel. *Neurosurgery* 2010;66:851-861.
- ³⁹ Meshberger FL. An interpretation of Michelangelo's *Creation of Adam* based on neuroanatomy. *Jama* 1990;264:1837-1841.
- ⁴⁰ Salzman M. The creation of Adam by Michelangelo Buonarroti (1475-1564). *Neurosurgery* 2006;59:11-12.
- ⁴¹ Asa SL. Pituitary histopathology in man: normal and abnormal. *Endotext.org* 2007;1-34.
- ⁴² Kaplan SA. The pituitary gland: a brief history. *Pituitary* 2007;10:323-325.
- ⁴³ Bayliss WM, Starling GH. The mechanisms of pancreatic secretion. *J Physiol* 1902;28:325-353.
- ⁴⁴ Herder WW. Acromegaly and gigantism in the medical literature. Case descriptions in the era before and the early years after the initial publication of Pierre Marie (1886). *Pituitary* 2009;12:236-244.
- ⁴⁵ Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumors. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009;4:97-126.
- ⁴⁶ Denk CC, Onderoglu S, Ilgi S, et al. Height of normal pituitary gland on MRI: differences between age groups and sexes. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1999;76:81-87.
- ⁴⁷ Chanson P, Daujat F, Young J, et al. Normal pituitary hypertrophy as a frequent cause of pituitary incidentaloma: a follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3009-3015.
- ⁴⁸ Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 2002;295;2231-2235.
- ⁴⁹ Drolet DW, Scully KM, Simmons DM, et al. TEF, a transcription factor expressed specifically in the anterior pituitary during embryogenesis, defines a new class of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 1991;5:1739-1753.
- ⁵⁰ Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, et al. Reciprocal interactions of Pit-1 and GATA-2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 1999;97:587-598.
- ⁵¹ Sam S, Frohman LA. Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2008;37:1-22.
- ⁵² Cohen LE, Radovick S. Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies. *Endocr Rev* 2002;23:431-442.
- ⁵³ Baumann G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr Rev* 1991;12:424-449.
- ⁵⁴ Parker ML, Utiger RD, Daughaday WH. Studies on human growth hormone. II. The physiological disposition and metabolic fate of human growth hormone in man. *J Clin Invest* 1962;41:262-268.
- ⁵⁵ Hofland LJ, Feelders RA, de Herder WW, et al. Pituitary tumours: The sst/D2 receptors as molecular targets. *Mol Cell Endocrinol* 2010;326:89-98.
- ⁵⁶ Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, et al. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:86-88.
- ⁵⁷ Ben-Shlomo A, Melmed S. Pituitary somatostatin receptor signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:123-133.
- ⁵⁸ Florio T. Somatostatin/somatostatin receptor signalling: phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Endocrinol* 2008;286:40-48.
- ⁵⁹ Weckbecker G, Lewis I, Albert R, et al. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:999-1017.
- ⁶⁰ Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-660.
- ⁶¹ Smith RG, Jiang H, Sun Y. Developments in ghrelin biology and potential clinical relevance. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:436-442.
- ⁶² Bonnefont X, Lacampagne A, Sanchez-Hormigo A, et al. Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16880-16885.

- ⁶³ Stolar MW, Baumann G. Secretory patterns of growth hormone during basal periods in man. *Metabolism* 1986;35:883–888.
- ⁶⁴ Van Cauter E, Plat L, Copinschi G. Interrelations between sleep and the somatotrophic axis. *Sleep* 1998;21:553–566.
- ⁶⁵ Jaffe CA, Ocampo-Lim B, Guo W, et al. Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic. *J Clin Invest* 1998;102:153–164.
- ⁶⁶ Riedel M, Hoelt B, Blum WF, et al. Pulsatile growth hormone secretion in normal-weight and obese men: differential metabolic regulation during energy restriction. *Metabolism* 1995;44:605–610.
- ⁶⁷ Goldenberg N, Barkan A. Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007;36:37–55.
- ⁶⁸ Frohman LA, Downs TR, Clarke IJ, et al. Measurement of growth hormone-releasing hormone and somatostatin in hypothalamic-portal plasma of unanesthetized sheep: spontaneous secretion and response to insulin-induced hypoglycemia. *J Clin Invest* 1990;86:17–24.
- ⁶⁹ Sato M, Frohman LA. Differential sensitivity of growth hormone-releasing hormone and somatostatin release from perfused mouse hypothalamic fragments in response to glucose deficiency. *Neuroendocrinology* 1993;57:1097–105.
- ⁷⁰ Knopf RF, Conn JW, Fajans SS, et al. Plasma growth hormone response to intravenous administration of amino acids. *J Clin Endocrinol Metab* 1965;25:1140–1144.
- ⁷¹ Kelijman M, Frohman LA. The role of the cholinergic pathway in growth hormone feedback. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1081–1087.
- ⁷² Imaki T, Shibasaki T, Shizume K, et al. The effect of free fatty acids on growth hormone (GH) releasing hormone-mediated GH secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:290–293.
- ⁷³ Veldhuis JD, Metzger DL, Martha PM Jr, et al. Estrogen and testosterone, but not a nonaromatizable androgen, direct network integration of the hypothalamo-somatotrope (growth hormone)-insulin-like growth factor I axis in the human: evidence from pubertal pathophysiology and sex-steroid hormone replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3414–3420.
- ⁷⁴ Cone RD, Low MJ, Elmquist JK, et al. *Neuroendocrinology*. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, et al, editors. *Williams textbook of endocrinology*. 11th edition. Philadelphia: Saunders 2008, p. 81–177.
- ⁷⁵ Horseman ND. Prolactin. In: DeGroot LJ, Jameson JL, editors. *Endocrinology*. 5th edition. Philadelphia: Saunders; 2005, p. 209–219.
- ⁷⁶ Zhu X, Lin CR, Prefontaine GG, et al. Genetic control of pituitary development and hypopituitarism. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:332–340.
- ⁷⁷ Charles V. Clevenger, Wan-Pin Chang, et al. Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma. Charles V. Clevenger, Wan-Pin Chang, et al. *Am J Pathol* 1995;146:695–705.
- ⁷⁸ Ormandy CJ, Sutherland RL: Mechanisms of prolactin receptor regulation in mammary gland. *Mol Cell Endocrinol* 1993;91:C1–C6.
- ⁷⁹ Kelly PA, Ali S, Rozakis M, et al. The growth hormone/prolactin receptor family. *Recent Prog Horm Res* 1993;48:123–164.
- ⁸⁰ Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998;19:225–268.
- ⁸¹ Nagano M, Kelly PA. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 1994;269:13337–13345.
- ⁸² Missale C, Nash, SR Robinson, et al. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998;78:189–225.
- ⁸³ Pivonello R, Ferone D, Lombardi G, et al. Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 2007;156(Suppl 1):S13–21.
- ⁸⁴ Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:125–132.
- ⁸⁵ Rocheville M, Lange DC, Kumar U, et al. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 2000;288:154–157.
- ⁸⁶ Magner JA. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity. *Endocr Rev* 1990;11:354–385.
- ⁸⁷ Lechan RM, Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res* 2006;153:209–235.

- ⁸⁸ Popovic V, Duntas LH. Leptin, TRH and ghrelin: influence on energy homeostasis at rest and during exercise. *Horm Metab Res* 2005;37:533–537.
- ⁸⁹ Williams TC, Kelijman M, Crelin WC, et al. Differential effects of somatostatin and a somatostatin analog, SMS 201-995, on the secretion of growth hormone and thyroid-stimulating hormone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:39–45.
- ⁹⁰ Cooper DS, Klibanski A, Ridgway EC. Dopaminergic modulation of TSH and its subunits: in vivo and in vitro studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1983;18:265–275.
- ⁹¹ Mariotti S, Franceschi C, Cossarizza A, et al. The aging thyroid. *Endocr Rev* 1995;16:686–715.
- ⁹² Prummel MF, Brokken LJ, Wiersinga WM. Ultra short-loop feedback control of thyrotropin secretion. *Thyroid* 2004;14:825–829.
- ⁹³ Lloyd RV, Jin L, Tsumanuma I, et al. Leptin and leptin receptor in anterior pituitary function. *Pituitary* 2001;4:33–47.
- ⁹⁴ Scheen AJ, Buxton OM, Jison M, et al. Effects of exercise on neuroendocrine secretions and glucose regulation at different times of day. *Am J Physiol* 1998;274:E1040–1049.
- ⁹⁵ Nicoloff JT, Fisher DA, Appleman MD Jr. The role of glucocorticoids in the regulation of thyroid function in man. *J Clin Invest* 1970;49:1922–1929.
- ⁹⁶ Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, et al. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 2001;104:849–859.
- ⁹⁷ Jacobson L. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005;34:271–292.
- ⁹⁸ The 11th Meeting of the International Pituitary Pathology Society October 16-20, 2009 Awaji Island, Japan. *Endocr Pathol* 2010;21:48-68
- ⁹⁹ DeBold CR, Decherney GS, Jackson RV, et al. Effect of synthetic ovine corticotropin-releasing factor: prolonged duration of action and biphasic response of plasma adrenocorticotropin and cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:294–298.
- ¹⁰⁰ Bousquet C, Ray DW, Melmed S. A common pro-opiomelanocortin-binding element mediates leukemia inhibitory factor and corticotropin-releasing hormone transcriptional synergy. *J Biol Chem* 1997;272:10551–10557.
- ¹⁰¹ Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, et al. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res* 1987;43:113–173.
- ¹⁰² Munck A, Naray-Fejes-Toth A. Glucocorticoid action: physiology. In: DeGroot LJ, Jameson JL, editors. *Endocrinology*. 5th edition. Philadelphia: Saunders 2005, p. 1632–1646.
- ¹⁰³ White A, Ray DW. Adrenocorticotrophic hormone. In: DeGroot LJ, Jameson JL, editors. *Endocrinology*. 5th edition. Philadelphia: Saunders 2005, p. 221–233.
- ¹⁰⁴ Neill JD. GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology* 2002;143:737–743.
- ¹⁰⁵ Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe IR. Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocr Rev* 1993;14:241–254.
- ¹⁰⁶ Matsuo H, Baba Y, Nair RM, et al. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;43:1334–1339.
- ¹⁰⁷ Baba Y, Matsuo H, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;44:459–463.
- ¹⁰⁸ Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, et al. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev* 2004;25:235–275.
- ¹⁰⁹ Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, et al. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 1978;202:631–633.
- ¹¹⁰ Filicori M, Santoro N, Merriam GR, et al. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:1136–1144.
- ¹¹¹ Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, et al. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology* 1991;128:509–517.
- ¹¹² Shupnik MA. Effects of gonadotropin-releasing hormone on rat gonadotropin gene transcription in vitro: requirement for pulsatile administration for luteinizing hormone-beta gene stimulation. *Mol Endocrinol* 1990;4:1444–1450.

- ¹¹³ Ferris HA, Shupnik MA. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GnRH1. *Biol Reprod* 2006;74:993–998.
- ¹¹⁴ Marshall JC. Regulation of gonadotropin synthesis and secretion. In: DeGroot LJ, Jameson JL editor. *Endocrinology*. 5th edition. Philadelphia: Saunders 2001, p. 248–257.
- ¹¹⁵ Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, et al. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005;146:623–630.
- ¹¹⁶ Roseweir AK, Millar RP. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum Reproduction Update*;2009;1:203–212.
- ¹¹⁷ Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1731–1737.
- ¹¹⁸ West A, Vojta PJ, Welch DR, et al. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 1998;54:145–148.
- ¹¹⁹ Clements MK, McDonald TP, Wang R, et al. FMRamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:1189–1193.
- ¹²⁰ Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001;276:34631–34636.
- ¹²¹ Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biol Reprod* 2008;79:776–786.
- ¹²² Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, et al. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*oryzias latipes*). *Endocrinology* 2008;149:2467–2476.
- ¹²³ van Aarle R, Kille P, Lange A, et al. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* 2008;29:57–64.
- ¹²⁴ Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1357–1363.
- ¹²⁵ Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004;145:4073–4077.
- ¹²⁶ Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004;80:264–272.
- ¹²⁷ Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1761–1766.
- ¹²⁸ Castellano JM, Gaytan M, Roa J, et al. Expression of KISS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 2006;147:4852–4862.
- ¹²⁹ Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, et al. Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor GPR54, to atherosclerosis prone vessels. *Endocrinology* 2006;148:140–147.
- ¹³⁰ Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 1981;2:186–209.
- ¹³¹ Katt JA, Duncan JA, Herbon L, et al. The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 1985;116:2113–2115.
- ¹³² Welt C, Sidis Y, Keutmann H, et al. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med* 2002;227:724–752.
- ¹³³ Ling N, Ying SY, Ueno N, et al. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 1986;321:779–782.
- ¹³⁴ Ueno N, Ling N, Ying SY, et al. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8282–8286.
- ¹³⁵ Bilezikjian LM, Blount AL, Donaldson CJ, et al. Pituitary actions of ligands of the TGFbeta family: activins and inhibins. *Reproduction* 2006;132:207–215.
- ¹³⁶ Vale W, Rivier J, Vaughan J, et al. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 1986;321:1121–1131.
- ¹³⁷ Risbridger GP, Schmitt JF, Robertson DM. Activins and inhibins in endocrine and other tumors. *Endocr Rev* 2001;22:836–858.

- ¹³⁸ Nakamura T, Takio K, Eto Y, et al. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 1990;247:836–838.
- ¹³⁹ Rivier C, Vale W. Effect of recombinant activin-A on gonadotropin secretion in the female rat. *Endocrinology* 1991;129:2463–2465.
- ¹⁴⁰ Carroll RS, Kowash PM, Lofgren JA, et al. In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology* 1991;129:3299–3304.
- ¹⁴¹ McConnell DS, Wang Q, Sluss PM, et al. A two-site chemiluminescent assay for activin-free follistatin reveals that most follistatin circulating in men and normal cycling women is in an activin-bound state. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:581–588.
- ¹⁴² Thompson TB, Lerch TF, Cook RW, et al. The structure of the follistatin: activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell* 2005;9:535–543.
- ¹⁴³ Burger LL, Dalkin AC, Aylor KW, et al. GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes—assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology* 2002;143:3243–3249.
- ¹⁴⁴ Dalkin AC, Haisenleder DJ, Gilrain JT, et al. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin subunit gene expression in female rats: actions on follicle-stimulating hormone beta messenger ribonucleic acid (mRNA) involve differential expression of pituitary activin (beta-B) and follistatin mRNAs. *Endocrinology* 1999;140:903–908.
- ¹⁴⁵ Bilezikjian LM, Blount AL, Vale WW. The cellular actions of vasopressin on corticotrophs of the anterior pituitary: resistance to glucocorticoid action. *Mol Endocrinol* 1987;1:451–458.
- ¹⁴⁶ Lewis KA, Gray PC, Blount AL, et al. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 2000;404:411–414.
- ¹⁴⁷ Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, et al. Inhibin-B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1321–1325.
- ¹⁴⁸ Handelsman DJ, Spaliviero JA, Phippard AF. Highly vectorial secretion of inhibin by primate Sertoli cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1235–1238.
- ¹⁴⁹ Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol* 2001;145:561–571.
- ¹⁵⁰ López-Muñoz F, Marín F, Alamo C. The historical background of the pineal gland: I. From a spiritual valve to the seat of the soul. *Rev Neurol* 2010;50:50–57.
- ¹⁵¹ López-Muñoz F, Marín F, Alamo C. The historical background of the pineal gland: II. From the seat of the soul to a neuroendocrine organ. *Rev Neurol* 2010;50:117–125.
- ¹⁵² Damásio AR. *O Erro de Descartes - Emoção, Razão e Cérebro Humano*. Europa América, 1994.
- ¹⁵³ Dolan B. Soul searching: a brief history of the mind/body debate in the neurosciences. *Neurosurg Focus*. 2007;23:1–7.
- ¹⁵⁴ Hrushesky WJ, Grutsch J, Wood P, et al. Circadian clock manipulation for cancer prevention and control and the relief of cancer symptoms. *Integr Cancer Ther* 2009;8:387–397.
- ¹⁵⁵ Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV et al. Pathobiology of pituitary adenomas and carcinomas. *Neurosurgery* 2006;59:341–353.
- ¹⁵⁶ Daly AF, Burlacu MC, Livadariu E, Beckers A. The epidemiology and management of pituitary incidentalomas. *Horm Res* 2007;68(Suppl.5):195–198.
- ¹⁵⁷ Daly SF, Rixhon M, Adam C et al. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;69:432–435.
- ¹⁵⁸ Clayton RN. Sporadic pituitary adenomas: from epidemiology to use of databases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999;13:451–460.
- ¹⁵⁹ Ambrosi B, Faglia G. Epidemiology of pituitary tumors. In Faglia G, Beck-Peccoz P & Ambrosi B (eds.). *Pituitary adenomas: new trends in basic and clinical research*. Amsterdam: Elsevier, 1991, pp. 159–168.
- ¹⁶⁰ Fernandez A, Karavitaki N, Wass JA. Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;72:377–382.
- ¹⁶¹ Raappana A, Koivukangas J, Ebeling T, Pirilä T. Incidence of pituitary adenomas in Northern Finland in 1992–2007. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4268–4275.
- ¹⁶² Beckers A. Higher prevalence of clinically relevant pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;72:290–291.
- ¹⁶³ Levy A. Molecular and trophic mechanisms of tumorigenesis. *Endocrinol Clin N Am* 2008;37:23–50.

- ¹⁶⁴ Dworakowska D, Grossman AB. The pathophysiology of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23:525-541.
- ¹⁶⁵ Asa SL. Practical pituitary pathology. What does the pathologist need to know? *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1231-1240.
- ¹⁶⁶ Mindermann T. Letter to the Editor: classification of pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)* 1997;139:267-270.
- ¹⁶⁷ DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. *Tumours of Endocrine Organs*. Lyon, France: IARC Press; 2004. World Health Organization Classification of Tumours.
- ¹⁶⁸ Chacko G, Chacko AG, Lombardero M, et al. Clinicopathologic correlates of giant pituitary adenomas. *J Clin Neuroscience* 2009;16:660-665.
- ¹⁶⁹ Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* 1998;19:798-827.
- ¹⁷⁰ Asa SL, Ezzat S. Molecular basis of pituitary development and cytogenesis. *Front Horm Res* 2004;32:1-19.
- ¹⁷¹ Asa SL, Puy LA, Lew AM, et al. Cell type-specific expression of the pituitary transcription activator Pit-1 in the human pituitary and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1275-1280.
- ¹⁷² Friend KE, Chiou Y-K, Laws ER Jr, et al. Pit-1 messenger ribonucleic acid is differentially expressed in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1281-1286.
- ¹⁷³ Friend KE, Chiou YK, Lopes MBS, et al. Estrogen receptor expression in human pituitary: correlation with immunohistochemistry in normal tissue, and immunohistochemistry and morphology in macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1497-1504.
- ¹⁷⁴ Zafar M, Ezzat S, Ramyar L, et al. Cell-specific expression of estrogen receptor in the human pituitary and its adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3621-3627.
- ¹⁷⁵ Asa SL, Bamberger A-M, Cao B, et al. The transcription activator steroidogenic factor-1 is preferentially expressed in the human pituitary gonadotroph. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2165-2170.
- ¹⁷⁶ Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, et al. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 2001;104:849-859.
- ¹⁷⁷ Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, et al. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev* 1996;10:1284-1295.
- ¹⁷⁸ Poulin G, Turgeon B, Drouin J. NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol*. 1997;17:6673-6682.
- ¹⁷⁹ Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, et al. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 1988;55:519-529.
- ¹⁸⁰ Mangalam HJ, Albert VR, Ingraham HA, et al. A pituitary POU domain protein, Pit-1, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally. *Genes Dev* 1989;3:946-958.
- ¹⁸¹ Li S, Crenshaw EB III, Rawson EJ, et al. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* 1990;347:528-533.
- ¹⁸² Ingraham HA, Albert VR, Chen R, et al. A family of POU-domain and Pit-1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development. *Annu Rev Physiol* 1990;52:773-791.
- ¹⁸³ Rosenfeld MG. POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev* 1991;5:897-907.
- ¹⁸⁴ Yan G, Pan WT, Bancroft C. Thyrotropin-releasing hormone action on the prolactin promoter is mediated by the POU protein Pit-1. *Mol Endocrinol* 1991;5:535-541.
- ¹⁸⁵ Day RN, Koike S, Sakai M, et al. Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene. *Mol Endocrinol* 1990;4:1964-1971.
- ¹⁸⁶ Drolet DW, Scully KM, Simmons DM, et al. TEF, a transcription factor expressed specifically in the anterior pituitary during embryogenesis, defines a new class of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 1991;5:1739-1753.
- ¹⁸⁷ Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 2002;295:2231-2235.
- ¹⁸⁸ Frawley LS, Boockfor FR. Mammotrophs: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. *Endocr Rev* 1991;12:337-355.

- ¹⁸⁹ Horvath E, Lloyd RV, Kovacs K. Propylthiouracil-induced hypothyroidism results in reversible transdifferentiation of somatotrophs into thyroidectomy cells: a morphologic study of the rat pituitary including immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 1990;63:511-520.
- ¹⁹⁰ Colao A, Savastano S. Medical treatment of prolactinomas. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:267-78.
- ¹⁹¹ Asa SL. 1998. Tumors of the pituitary gland. In *Atlas of Tumor Pathology*, 3rd ser., fascicle 22. Washington, DC: Armed Forces Inst Pathol.
- ¹⁹² Nosé V. Pituitary adenomas: a practical guide for diagnosis. *Endocr Pathol* 2010;21:54-55.
- ¹⁹³ Alexander JM, Biller BM, Bikkal H et al. Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest* 1990;86:336-340.
- ¹⁹⁴ Herman V, Fagin J, Gonsky R et al. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1427-1433.
- ¹⁹⁵ Melmed S. Pituitary neoplasia. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1994;23:81-92.
- ¹⁹⁶ Tanase CP, Neagu M, Albuiescu R. Key signaling molecules in pituitary tumors. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9:859-877.
- ¹⁹⁷ Ezzat S. Epigenetics in the pathogenesis of pituitary tumors. *Endocr Pathol* 2010;21:50-51
- ¹⁹⁸ Hirvonen A. Combinations of susceptible genotypes and individual responses to toxicants. *Environ Health Perspect* 1997;105:755-758.
- ¹⁹⁹ Idle JR. Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mutat Res* 1991;24:259-266.
- ²⁰⁰ Nebert DW. Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. *Mutat Res* 1991;247:267-281.
- ²⁰¹ Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* 1991;Suppl 51:5023s-5044s.
- ²⁰² Hirvonen A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J Occup Environ Med* 1995;37:37-43.
- ²⁰³ Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, et al. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7293-7297.
- ²⁰⁴ Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300:271-276.
- ²⁰⁵ Zhong S, Wyllie H, Barnes D, et al. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993;14:1821-1824.
- ²⁰⁶ Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vainio H. The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* 1993;14:1479-1481.
- ²⁰⁷ Bell D, Taylor JA, Paulson D, et al. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1159-1164.
- ²⁰⁸ Lafuente A, Pujol F, Carretero P, et al. Human glutathione S-transferase I. (GSTp) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett* 1993;68:49-54.
- ²⁰⁹ Elexpuru-Camiruaga J, Buxton N, Kandula V, et al. Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res* 1995;55:237-239.
- ²¹⁰ Chen H, Sandler DP, Taylor JA, et al. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet* 1996;347:295-297.
- ²¹¹ Perrett CW, Clayton RN, Pistorello M, et al. GSTM1 and CYP2D6 genotype frequencies in patients with pituitary tumours: effects on P53, ras and gsp. *Carcinogenesis* 1995;16:1643-1645.
- ²¹² Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, et al. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 2006;312:1228-1230.
- ²¹³ Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett* 2007;581:3608-3615.
- ²¹⁴ Ozfirat Z, Korbonits M. AIP gene and familial isolated pituitary adenomas. *Mol Cell Endocrinol* 2010;326:71-79.
- ²¹⁵ Pesatori AC, Baccarelli A, Consonni D, et al. Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein and pituitary adenomas: a population-based study on subjects exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident. *Eur J Endocrinol* 2008;159:699-703.

- ²¹⁶ Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987;196:261–282.
- ²¹⁷ Siegfried Z, Cedar H. DNA methylation: a molecular lock. *Current Biol* 1997;7:R305–R307.
- ²¹⁸ Futscher BW, Oshiro RJ, Wozniak N, et al. Role of DNA methylation in the control of cell type specific mapsin expression. *Nat Genet* 2002;31:175–179.
- ²¹⁹ Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human Molecular Genetics* 2007;16:R50–R59.
- ²²⁰ Burgers WA, Fuks F, Kouzarides T. DNA methyltransferase get connected to chromatin. *Trends Gen* 2002;18:275–277.
- ²²¹ McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, et al. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Research* 2006;66:3541–3549.
- ²²² Dudley KJ, Revill K, Clayton RN, et al. Pituitary tumours: all silent on the epigenetics front. *J Mol Endocrinol* 2009;42:461–468.
- ²²³ Nunes MCP, Sobrinho LG, Calhaz-Jorge C, et al. Psychosomatic factors in patients with hyperprolactinemia and/or galactorrhea. *Obstet Gynecol* 1980;64:465–468.
- ²²⁴ Sobrinho LG. Prolactin, psychological stress and environment in humans: adaptation and maladaptation. *Pituitary* 2003;6:35–39.
- ²²⁵ Sonino N, Navarrini C, Fallo F, et al. Life events in the pathogenesis of hyperprolactinemia. *Eur J Endocrinol* 2004;151:61–65.
- ²²⁶ Assies J, Vingerhoets AJJM, Poppelaars K. Psychosocial aspects of hyperprolactinemia. *Psychoneuroendocrinology* 1992;17:673–679.
- ²²⁷ Sobrinho LG, Duarte JS, Paiva I, et al. Paternal deprivation prior to adolescence and vulnerability to pituitary adenomas. *Pituitary* 2011, In press.
- ²²⁸ Sobrinho L, Duarte S, Paiva I, et al. Privação paterna precoce e adenomas hipofisários. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo* 2010; 5:171–172.
- ²²⁹ Chen J, Hersmus N, Van Duppen V, et al. The adult pituitary contains a cell population displaying stem/progenitor cell and early embryonic characteristics. *Endocrinology* 2005;146:3985–3998.
- ²³⁰ Taniguchi Y, Tamatani R, Yasutaka S, et al. Proliferation of pituitary corticotrophs following adrenalectomy as revealed by immunocytochemistry combined with bromodeoxyuridine-labeling. *Histochem Cell Biol* 1995;103:127–130.
- ²³¹ Nolan LA, Levy A. A population of non-LH/non-ACTH-positive cells in the male rat anterior pituitary responds mitotically to both gonadectomy and adrenalectomy. *J Neuroendocrinol* 2006;18:655–661.
- ²³² Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100:143–155.
- ²³³ Nunez L, Villalobos C, Senovilla L, et al. Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism. *J Physiol* 2003;549:835–843.
- ²³⁴ Aoki MP, Aoki A, Maldonado CA. Sexual dimorphism of apoptosis in lactotrophs induced by bromocryptine. *Histochem Cell Biol* 2001;116:215–222.
- ²³⁵ Scheithauer BW, Horvath E, Kovacs K, et al. Plurihormonal pituitary adenomas. *Semin Diagn Pathol* 1986;3:69–82.
- ²³⁶ Ho DM, Hsu CY, Ting LT, et al. Plurihormonal pituitary adenomas: immunostaining of all pituitary hormones is mandatory for correct classification. *Histopathology* 2001;39:310–319.
- ²³⁷ Furuhashi S, Kameya T, Otani M, et al. Prolactin presents in all pituitary tumors of acromegalic patients. *Hum Pathol* 1993;24:10–15.
- ²³⁸ Ma W, Ikeda H, Yoshimoto T. Clinicopathologic study of 123 cases of prolactin-secreting pituitary adenomas with special reference to multihormone production and clonality of the adenomas. *Cancer* 2002;95:258–266.
- ²³⁹ Clayton RN, Farrell WE. Clonality of pituitary tumours: more complicated than initially envisaged? *Brain Pathol* 2001;11:313–327.
- ²⁴⁰ Zahedi A, Booth GL, Smyth HS, et al. Distinct clonal composition of primary and metastatic adrenocorticotrophic hormone-producing pituitary carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:549–556.
- ²⁴¹ Sotillo R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, et al. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* 2007;11:9–23.
- ²⁴² Anniko M, Tribukait B, Wersall J. DNA ploidy and cell phase in human pituitary tumors. *Cancer* 1984;53:1708–1713.

- ²⁴³ Chahal HS, Chapple JP, Frohman LA, et al. Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:419-427.
- ²⁴⁴ Beckers A, Jaffrain-Rea ML, Daly AE. Genetics of familial pituitary adenomas. *Bull Acad Natl Med* 2009;193:1557-1570.
- ²⁴⁵ Carney JA. The Carney complex (myxomas, spotty pigmentation, endocrine overactivity and schwannomas). *Dermatol Clin* 1995;13:19-26.
- ²⁴⁶ Lumbroso S, Paris F, Sultan C. Activating Gs-alpha mutations: analysis of 113 patients with signs of McCune-Albright syndrome-a European collaborative study. *J Clin Endocr Metab* 2004;89:2107-2113.
- ²⁴⁷ Scheithauer BW, Laws EJ, Kovacs K, et al. Pituitary adenomas of the multiple endocrine neoplasia type I syndrome. *Sem Diagn Pathol* 1987;4:205-211.
- ²⁴⁸ Falchetti A, Marini F, Luzi E, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): not only inherited endocrine tumors. *Genet Med* 2009;11:825-835.
- ²⁴⁹ Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia-syndromes of the twentieth century. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2617-2620.
- ²⁵⁰ Marini F, Falchetti A, Del Monte F, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1. *Orphanet J Rare Dis* 2006;2;1:38.
- ²⁵¹ Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, et al. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia type 1. *Science* 1997;276:404-407.
- ²⁵² Larsson C, Skogseid B, Oberg K et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature* 1988;332:85-87.
- ²⁵³ Lemos M, Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutation* 2008;29:22-32.
- ²⁵⁴ Hai N, Aoki N, Shlmatsu A, et al. Clinical features of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) phenocopy without germline MEN1 gene mutations: analysis of 20 Japanese sporadic cases with MEN1. *Clin Endocrinol* 2000;52:509-518.
- ²⁵⁵ Burgess JR, Nord B, David R, et al. Phenotype and phenocopy: the relationship between genotype and clinical phenotype in a single large family with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1). *Clin Endocrinol* 2000;53:205-211.
- ²⁵⁶ Agarwal SK, Impey S, McWeeney S, et al. Distribution of menin-occupied regions in chromatin specifies a broad role of menin in transcriptional regulation. *Neoplasia* 2007;9:101-107.
- ²⁵⁷ Verges B, Boureille F, Goudet P, et al. Pituitary disease in Men type 1 (MEN 1): data from the France - Belgium MEN 1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:457-465.
- ²⁵⁸ Cavaco BM, Domingues R, Bacelar MC, et al. Mutational analysis of Portuguese families with multiple endocrine neoplasia type 1 reveals large germline deletions. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002 ;56:465-473.
- ²⁵⁹ Turner JJ, Christie PT, Pearce SH, et al. Diagnostic challenges due to phenocopies: lessons from Multiple Endocrine Neoplasia type1 (MEN1). *Hum Mutat* 2010;31:E1089-E1101.
- ²⁶⁰ Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, et al. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc National Acad Scienc USA* 2006;103:15558-15563.
- ²⁶¹ Igreja S, Chahal HS, Akker SA, et al. Assessment of p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) and AIP (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein) genes in MEN1 syndrome patients without any detectable MEN1 gene mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008. *Clin Endocrinol*;70:259-264.
- ²⁶² Fritz A, Walch A, Piotrowska K, et al. Recessive transmission of a multiple endocrine neoplasia syndrome in the rat. *Cancer Res* 2002;62:3048-3051.
- ²⁶³ Piotrowska K, Pellegata NS, Rosemann M, et al. Mapping of a novel MEN-like syndrome locus to rat chromosome 4. *Mammalian Genome* 2004;15:135-141.
- ²⁶⁴ Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, et al. Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3321-3325.
- ²⁶⁵ Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93: 2390-2401
- ²⁶⁶ Ozawa A, Agarwal SK, Mateo CM, et al. The parathyroid/pituitary variant of multiple endocrine neoplasia type 1 usually has causes other than p27Kip1 mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92: 1948-1951.

- ²⁶⁷ Muşat M, Morris DG, Korbonits M, Grossman AB. Cyclins and their related proteins in pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2010;326:25-29.
- ²⁶⁸ Boikos S, Stratakis CA. Carney complex: the first 20 years. *Cur Opin Oncol* 2007;19:24-29.
- ²⁶⁹ Pack SD, Kirschner LS, Pak E, et al. Genetic and histologic studies of somatomammotropic pituitary tumors in patients with the “complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity and schwannomas” (Carney complex). *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3860-3865.
- ²⁷⁰ Fajardo-Montaña C, Daly, AF, Riesgo-Suárez P, et al. Mutações de AIP em adenomas hipofisários familiares e esporádicos: experiência local y revisión de la literatura. *Endocrinol Nutr* 2009;56:369-377.
- ²⁷¹ Bertherat J, Horvath A, Groussin L, et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2085-2091.
- ²⁷² Veugelers M, Wilkes D, Burton K et al. Comparative PRKAR1A genotype-phenotype analyses in humans with Carney complex and *prkar1a* haploinsufficient mice. *Proc Nat Acad Scien USA* 2004;101:14222-14227.
- ²⁷³ Kaltsas GA, Kola B, Borboli N et al. Sequence analysis of the PRKAR1A gene in sporadic somatotroph and other pituitary tumours. *Clin Endocrinol* 2002;57:443-448.
- ²⁷⁴ Sandrini F, Kirschner LS, Bei T et al. PRKAR1A, one of the Carney complex genes, and its locus (17q22-24) are rarely altered in pituitary tumours outside the Carney complex. *J Med Genet* 2002;39:e78.
- ²⁷⁵ Kirschner LS. PRKAR1A and the evolution of pituitary tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2010;326:3-7.
- ²⁷⁶ Verloes A, Stevenaert A, Teh BT et al. Familial acromegaly: case report and review of the literature. *Pituitary* 1999;1:273-277.
- ²⁷⁷ Valdes-Socin H, Poncin J, Stevens V et al. Adenomes hypophysaires familiaux isoles non lies avec la mutation somatique NEM-1. Suivi de 27 patients. *Ann Endocrinol* 2000;61:301.
- ²⁷⁸ Beckers A, Daly AF. The clinical, pathological, and genetic features of familial isolated pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007;157:371-382.
- ²⁷⁹ Daly AF, Jaffrain-Rea ML, Ciccarelli A, et al. Clinical characterization of familial isolated pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3316-3323.
- ²⁸⁰ Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, et al. The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol* 2007;66:499-502.
- ²⁸¹ Toledo RA, Lourenco Jr. DM, Liberman B, et al. Germline mutation in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene in familial somatotropinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1934-1937.
- ²⁸² Igreja S, Chahal HS, King P, et al. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat* 2010;31:1-11.
- ²⁸³ Barlier A, Vanbellinghen JF, Daly AF, et al. Mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein gene are not highly prevalent among subjects with sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1952-1955.
- ²⁸⁴ Georgitsi M, Raitila A, Karhu A, et al. Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *Proc Nat Acad Scien USA* 2007;104:4101-4105.
- ²⁸⁵ Gadelha MR, Une KN, Rohde K, et al. Isolated familial somatotropinomas: establishment of linkage to chromosome 11q13.1-11q13.3 and evidence for a potential second locus at chromosome 2p16-12. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:707-714.
- ²⁸⁶ Petrulis JR, Perdew GH. The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact* 2002;141:25-40.
- ²⁸⁷ Davies TH, Sanchez ER. FKBP52. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:42-47.
- ²⁸⁸ Hillegass JM, Murphy KA, Villano CM, et al. The impact of aryl hydrocarbon receptor signaling on matrix metabolism: implications for development and disease. *Biol Chem* 2006;387:1159-1173.
- ²⁸⁹ Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2390-2401.
- ²⁹⁰ Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett*. 2007;581:3608-3615.
- ²⁹¹ Lees MJ, Peet DJ, Whitelaw ML. Defining the role for XAP2 in stabilization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* 2003;278:5878-5888.

- ²⁹² Kolluri SK, Weiss C, Koff A, Göttlicher M. p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev* 1999;13:1742-1753.
- ²⁹³ Ge NL, Elferink CJ. A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J Biol Chem* 1998;273:22708-22213.
- ²⁹⁴ Bolger GB, Peden AH, Steele MR, et al. Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *J Biol Chem* 2003;278:33351-3363.
- ²⁹⁵ 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;104:4101-4105.
- ²⁹⁶ Chahal HS et al. The clinical and genetic characteristics of patients with familial isolated pituitary adenomas. *Hormones* 2008, 11th International Workshop of MEN meeting, Delphi 7 (Suppl. 2), O8.
- ²⁹⁷ Frohman LA, Eguchi K. Familial acromegaly. *Growth Horm IGF Res* 2004;14(Suppl. A):S90-S96.
- ²⁹⁸ Daly AF, Vanbellinghen JF, Khoo SK, et al. Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations in familial isolated pituitary adenomas: analysis in 73 families. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1891-1896.
- ²⁹⁹ DiGiovanni R, Serra S, Ezzat S, Asa SL. AIP mutations are not identified in patients with sporadic pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2007;18:76-78.
- ³⁰⁰ Asa SL, Ezzat S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer* 2002;2:836-849.
- ³⁰¹ Karga HJ, Alexander JM, Hedley-Whyte ET, et al. Ras mutations in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:914-919.
- ³⁰² Herman V, Drazin NZ, Gonsky R, et al. Molecular screening of pituitary adenomas for gene mutations and rearrangements. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:50-55.
- ³⁰³ Boggild MD, Jenkinson S, Pistorello M, et al. Molecular genetic studies of sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:387-392.
- ³⁰⁴ Tanizaki Y, Jin L, Scheithauer BW, et al. P53 gene mutations in pituitary carcinomas. *Endocr Pathol* 2007;18:217-222.
- ³⁰⁵ Horvath, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of acromegaly: MEN1, Carney complex, McCune-Albright syndrome, familial acromegaly and genetic defects in sporadic tumors. *Rev Endoc Metab Dis* 2008;9:1-11.
- ³⁰⁶ Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, et al. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:761-767.
- ³⁰⁷ Zhang X, Sun H, Danila AC, et al. Loss of expression of GADD45 gamma, a growth inhibitory gene, in human pituitary adenomas: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;8:1262-1267
- ³⁰⁸ A Bahar, DJ Simpson and SJ Cutty et al. Isolation and characterization of a novel pituitary tumor apoptosis gene. *Molecular Endocrinology* 2004;18:1827-1839.
- ³⁰⁹ L Pei, S Melmed. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Molecular Endocrinology* 1997;11:433-441.
- ³¹⁰ F Salehi, K Kovacs, BW Scheithauer, et al. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocrine-related Cancer* 2008;15:721-743.
- ³¹¹ Wang Z, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) transforming and transactivation activity. *J Biol Chem* 2000;275:7459-7461.
- ³¹² Chamaon K, Kirches E, Kanakis D, et al. Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and non-neoplastic astrocytes. *Bioch Biophys Res Commun* 2005;331:86-92.
- ³¹³ Filippella M, Galland F, Kujas M, et al. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol* 2006;65:536-543.
- ³¹⁴ Musat M, Vax VV, Borboli N, et al. Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis. *Front Horm Res* 2004;32:34-62.
- ³¹⁵ Ogino A, Yoshino A, Katayama Y, et al. The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:398-403.
- ³¹⁶ Yoshino A, Katayama Y, Ogino A et al. Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas. *J Neuro-Oncol* 2007;83:153-162.

- ³¹⁷ Lloyd RV, Jin L, Qian X, et al. Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *American J Pathol* 1997;150:401–407.
- ³¹⁸ Lidhar K, Korbonits M, Jordan S, et al. Low expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal corticotroph cells, corticotroph tumors, and malignant pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3823–3830.
- ³¹⁹ Bahar A, Bicknell JE, Simpson DJ, et al. Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45gamma, in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation. *Oncogene* 2004;23:936–944.
- ³²⁰ Simpson DJ, Clayton RN, Farrell WE. Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion. *Oncogene* 2002;21:1217–1224.
- ³²¹ Zhang X, Sun H, Danila DC, et al. Loss of expression of GADD45 gamma, a growth inhibitory gene, in human pituitary adenomas: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1262–1267.
- ³²² Bahar A, Simpson DJ, Cutty SJ, et al. Isolation and characterization of a novel pituitary tumor apoptosis gene. *Mol Endocrinol* 2004;18:1827–1839.
- ³²³ Farrell WE. A novel apoptosis gene identified in the pituitary gland. *Neuroendocrinology* 2006;84:217–221.
- ³²⁴ Zhao J, Dahle D, Zhou Y et al. Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2179–2186.
- ³²⁵ Pagotto U, Arzberger T, Theodoropoulou M, et al. The expression of the antiproliferative gene ZAC is lost or highly reduced in nonfunctioning pituitary adenomas. *Cancer Res* 2000;60:6794–6799.
- ³²⁶ Boikos SA, Stratakis CA. Molecular genetics of the cAMP-dependent protein kinase pathway and of sporadic pituitary tumorigenesis. *Hum Mol Gen* 2007;16(Spec No 1):R80–R87.
- ³²⁷ Jordan S, Lidhar K, Korbonits M, et al. Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary. *Eur J Endocrinol* 2000;143:R1–R6.
- ³²⁸ Ruebel KH, Leontovich AA, Jin L, et al. Patterns of gene expression in pituitary carcinomas and adenomas analyzed by high-density oligonucleotide arrays, reverse transcriptase-quantitative PCR, and protein expression. *Endocrine* 2006;29:435–444.
- ³²⁹ Losa M, Franzin A, Mangili F, et al. Proliferation index of nonfunctioning pituitary adenomas: correlations with clinical characteristics and long-term follow-up results. *Neurosurgery* 2000;47:1313–1318.
- ³³⁰ Kaltsas GA, Nomikos P, Kontogeorgos G, et al. Clinical review: Diagnosis and management of pituitary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3089–3099.
- ³³¹ Neufeld TP, de la Cruz AF, Johnston LA, et al. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 1998;93:1183–1193.
- ³³² Stowers RS, Schwarz TL. A genetic method for generating *Drosophila* eyes composed exclusively of mitotic clones of a single genotype. *Genetics* 1999;152:1631–1639.
- ³³³ Adjei AA, Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005;23:5386–5403.
- ³³⁴ Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, et al. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 1997;89:457–467.
- ³³⁵ Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, et al. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 1997;385:544–548.
- ³³⁶ Volarevic S & Thomas G. Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog Nuc Acid Res Mol Biol* 2001;65:101–127.
- ³³⁷ Sonenberg N, Gingras AC. The mRNA 50 cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Cur Opin in Cell Biol* 1998;10:268–275.
- ³³⁸ Rosenwald IB, Kaspar R, Rousseau D, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem* 1995;270:21176–21180.
- ³³⁹ Musat M, Korbonits M, Kola B, et al. Enhanced protein kinase B/Akt signalling in pituitary tumours. *Endoc Relat Cancer* 2005;12:423–433.
- ³⁴⁰ Haystead TA, Dent P, Wu J, et al. Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Letters* 1992;306:17–22.

- ³⁴¹ Terada Y, Nakashima O, Inoshita S, et al. Mitogen-activated protein kinase cascade and transcription factors: the opposite role of MKK3/6-p38K and MKK1-MAPK. *Nephrol Dialy Transpl* 1999;14(Suppl. 1):45–47.
- ³⁴² Terada Y, Inoshita S, Nakashima O, et al. Regulation of cyclin D1 expression and cell cycle progression by mitogen-activated protein kinase cascade. *Kidney Internat* 1999;56:1258–1261.
- ³⁴³ Guan KL. The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cel Sign* 1994;6:581–589.
- ³⁴⁴ Joneson T, Bar-Sagi D. Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis. *J Mol Med* 1997;75:587–593.
- ³⁴⁵ Gueorguiev M, Grossman AB. Pituitary gland and beta-catenin signaling: from ontogeny to oncogenesis. *Pituitary* 2009;12:245-55.
- ³⁴⁶ Ewing I, Pedder-Smith S, Franchi G, et al. A mutation and expression analysis of the oncogene BRAF in pituitary adenomas. *Clin Endocrinol* 2007;66:348–352.
- ³⁴⁷ Morris DG, Musat M, Czirjak S, et al. Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis. *Eur J Endocrinol* 2005;153:143–151.
- ³⁴⁸ Dworakowska D, Teng M, Grozinsky-Glasberg S, et al. Extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) overactivation in pituitary adenomas. *The Endocrine Society's 90th Annual Meeting 2008, San Francisco, USA;2008:[P3–514]*.
- ³⁴⁹ McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enz Regul* 2006;46:249–279.
- ³⁵⁰ Ruebel KH, Leontovich AA, Jin L, et al. Patterns of gene expression in pituitary carcinomas and adenomas analyzed by high-density oligonucleotide arrays, reverse transcriptase-quantitative PCR, and protein expression. *Endocrine* 2006;29:435–444.
- ³⁵¹ Evans CO, Young AN, Brown MR, et al. Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3097–3107.
- ³⁵² Gueorguiev M, Grossman AB. Pituitary gland and beta-catenin signaling: from ontogeny to oncogenesis. *Pituitary* 2008;12:245-255.
- ³⁵³ Moreno CS, Evans CO, Zhan X, et al. Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses. *Cancer Res* 2005;65:10214–10222.
- ³⁵⁴ Evans CO, Moreno CS, Zhan X et, al. Molecular pathogenesis of human prolactinomas identified by gene expression profiling, RT-qPCR, and proteomic analyses. *Pituitary* 2008;11:231–235.
- ³⁵⁵ Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, et al. Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors. *Endocrinology* 2008;149:1235–1242.
- ³⁵⁶ Morris DG, Musat M, Czirjak S, et al. Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis. *Eur J Endocrinol* 2005;153:143–151.
- ³⁵⁷ Ribeiro-Oliveira A, Franchi G, Kola B, et al. Protein western array analysis in human pituitary tumours: insights and limitations. *End Related Cancer* 2008;15:1099-1114.
- ³⁵⁸ Zhan X, Evans CO, Oyesiku NM, et al. Proteomics and transcriptomics analyses of secretagogin down-regulation in human non-functional pituitary adenomas. *Pituitary* 2003;6:189–202.
- ³⁵⁹ Zhan X, Desiderio DM. *BMC Medical Genomics* 2010;3:1-26.
- ³⁶⁰ Heaney AP. Pituitary tumor pathogenesis. *Br Med Bull* 2006;75-76:81-97.
- ³⁶¹ Yoshida D, Nomura R, Teramoto A. Regulation of cell invasion and signalling pathways in the pituitary adenoma cell line, HP-75, by reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK). *J Neurooncol* 2008;89:141-150.
- ³⁶² Vlotides G, Eigler T, Melmed S. Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis. *Endocr Rev* 2007;28:165-86.
- ³⁶³ Xu M, Shorts-Cary L, Knox AJ, et al. Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 is overexpressed in human pituitary tumors: role in proliferation and survival. *Endocrinology* 2009;150:2064-2071.
- ³⁶⁴ Spada A, Arosio M, Bochicchio D, et al. Clinical, biochemical, and morphological correlates in patients bearing growth hormone-secreting pituitary tumors with or without constitutively active adenylyl cyclase. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1421–1426.

- ³⁶⁵ Williamson EA, Ince PG, Harrison D, et al. G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. *Eur J Clin Invest* 1995;25:128–31.
- ³⁶⁶ Tordjman K, Stern N, Ouaknine G, et al. Activating mutations of the Gs alpha-gene in nonfunctioning pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:765–769.
- ³⁶⁷ Asa SL, Digiovanni R, Jiang J, et al. A growth hormone receptor mutation impairs growth hormone autofeedback signaling in pituitary tumors. *Cancer Res* 2007;67:7505–7511.
- ³⁶⁸ Hubina E, Nanzer AM, Hanson MR, et al. Somatostatin analogues stimulate p27 expression and inhibit the MAP kinase pathway in pituitary tumours. *Eur J Endocrinol* 2006;155:371–379.
- ³⁶⁹ Ferone D, Gatto F, Arvigo M, et al. The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol* 2009;42:361–370.
- ³⁷⁰ Naor Z. Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol* 2009;30:10–29.
- ³⁷¹ Dobkin-Bekman M, Naidich M, Pawson AJ, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) by GnRH is cell-context dependent. *Mol Cell Endocrinol* 2006;252:184–190.
- ³⁷² Kraus S, Levy G, Hanoch T, et al. Gonadotropin-releasing hormone induces apoptosis of prostate cancer cells: role of c-Jun NH2-terminal kinase, protein kinase B, and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Cancer Res* 2004;64:5736–5744.
- ³⁷³ Kraus S, Naor Z, Seger R. Gonadotropin-releasing hormone in apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2006;234:109–123.
- ³⁷⁴ Heaney AP, Fernando M, Yong WH, Melmed S. Functional PPAR-gamma receptor is a novel therapeutic target for ACTH-secreting pituitary adenomas. *Nat Med* 2002;8:1281–1287.
- ³⁷⁵ Páez-Pereda M, Kovalovsky D, Hopfner U, et al. Retinoic acid prevents experimental Cushing syndrome. *J Clin Invest* 2001;108:1123–1131.
- ³⁷⁶ Heaney AP, Fernando M, Melmed S. Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *J Clin Invest*. 2002;109:277–83.
- ³⁷⁷ Rey-Roldán EB, Grillo CA, Pietranera L, et al. Levonorgestrel antagonism on estrogen-induced pituitary tumors is mediated by progesterone receptors. *Horm Metab Res* 2008;40:245–50.
- ³⁷⁸ Hunter JA, Skelly RH, Aylwin SJ, et al. The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2003;148:203–211.
- ³⁷⁹ Boikos SA, Stratakis CA. Molecular genetics of the cAMP-dependent protein kinase pathway and of sporadic pituitary tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2007;16 Spec No 1:R80–87.
- ³⁸⁰ Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, et al. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:721–743.
- ³⁸¹ Pei L. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function. *J Biol Chem* 2000;275:31191–31198.
- ³⁸² Romero F, Multon MC, Ramos-Morales F, et al. Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res* 2001;29:1300–1307.
- ³⁸³ Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:887–900.
- ³⁸⁴ Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, et al. Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell* 2001;105:445–457.
- ³⁸⁵ Bernal JA, Luna R, Espina A, et al. Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nat Genet* 2002;32:306–311.
- ³⁸⁶ Hamid T, Kakar SS. PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function. *Mol Cancer* 2004;3:18.
- ³⁸⁷ Filippella M, Galland F, Kujas M, et al. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:536–543.
- ³⁸⁸ Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, et al. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2006;17:143–153.
- ³⁸⁹ Fougner SL, Bollerslev J, Latif F, et al. Low levels of raf kinase inhibitory protein in growth hormone-secreting pituitary adenomas correlate with poor response to octreotide treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1211–1216.

- ³⁹⁰ Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, et al. Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 2004;151:233-240.
- ³⁹¹ Grossman AB. The molecular biology of pituitary tumors: a personal perspective. *Pituitary* 2009;12:265-270.
- ³⁹² Grossman AB, Korbonits M. Akting and cycling: a tale of the pituitary. *Horm Res* 2004;62 Suppl 3:117-123.
- ³⁹³ Garcia-Echeverria C, Sellers WR. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 2008;27:5511-5526.
- ³⁹⁴ Lin Y, Jiang X, Shen Y, et al. Frequent mutations and amplifications of the PIK3CA gene in pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer* 2009;16:301-310.
- ³⁹⁵ Zhu X, Wang J, Ju BG, Rosenfeld MG. Signaling and epigenetic regulation of pituitary development. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:605-611.
- ³⁹⁶ Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, et al. Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors. *Endocrinology* 2008;149:1235-1242.
- ³⁹⁷ Elston MS, Clifton-Bligh RJ. Identification of Wnt family inhibitors: a pituitary tumor directed whole genome approach. *Mol Cell Endocrinol* 2010;326:48-54.
- ³⁹⁸ Cañibano C, Rodriguez NL, Saez C, et al. The dependence receptor Ret induces apoptosis in somatotrophs through a Pit-1/p53 pathway, preventing tumor growth. *EMBO J*. 2007;26:2015-2028.
- ³⁹⁹ Skelly RH, Korbonits M, Grossman A, et al. Expression of the pituitary transcription factor Ptx-1, but not that of the trans-activating factor prop-1, is reduced in human corticotroph adenomas and is associated with decreased alpha-subunit secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2537-2542.
- ⁴⁰⁰ Quereda V, Malumbers M. Cell cycle control of pituitary development and disease. *J Mol Endocrinol* 2009;42:75-86.
- ⁴⁰¹ Ramsey MR, Krishnamurthy J, Pei XH, et al. Expression of p16Ink4a compensates for p18Ink4c loss in cyclin-dependent kinase 4/6-dependent tumors and tissues. *Cancer Res* 2007;67:4732-4741.
- ⁴⁰² Donangelo I, Gutman S, Horvath E, et al. Pituitary tumor transforming gene overexpression facilitates pituitary tumor development. *Endocrinology* 2006;147:4781-4791.
- ⁴⁰³ Donangelo I, Marcos HP, Araújo PB, et al. Expression of retinoblastoma protein in human growth hormone-secreting pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2005;16:53-62.
- ⁴⁰⁴ Greenman Y, Stern N. Non-functioning pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23:625-638.
- ⁴⁰⁵ Kwekkeboom DJ, de Jong FH, Lamberts SW. Gonadotropin release by clinically nonfunctioning and gonadotroph pituitary adenomas in vivo and in vitro: relation to sex and effects of thyrotropin-releasing hormone, gonadotropin-releasing hormone, and bromocriptine. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:1128-1135.
- ⁴⁰⁶ Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, et al. The prevalence of pituitary adenomas. A systematic review. *Cancer* 2004;101:613-619.
- ⁴⁰⁷ Buurman H, Saeger W. Subclinical adenomas in postmortem pituitaries: classification and correlations to clinical data. *Eur J Endocrinol* 2006;154:753-756.
- ⁴⁰⁸ Davis JRE, Farrel WE, Clayton RN. Pituitary tumors. *Reproduction* 2001;121:363-371.
- ⁴⁰⁹ Daly AF, Rixhon M, Adam C, et al. High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liège, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4769-4775.
- ⁴¹⁰ Saeger W, Ludecke DK, Buchfelder M, et al. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. *Eur J Endocrinol* 2007;156:203-216.
- ⁴¹¹ Korbonits M, Carlsen E. Recent clinical and pathophysiological advances in non-functioning pituitary adenomas. *Horm Res* 2009;71(suppl 2):123-130.
- ⁴¹² Daems T, Verhelst J, Michotte A, et al. Modification of hormonal secretion in clinically silent pituitary adenomas. *Pituitary* 2009;12:80-86.
- ⁴¹³ Hanson PL, Aylwin SJ, Monson JP, et al. FSH secretion predominates in vivo and in vitro in patients with non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2005;152:363-370.
- ⁴¹⁴ Grossman AB. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: is it clinically helpful? *Acta Neuropathol* 2006;111:76-77.
- ⁴¹⁵ Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, et al. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* 1999;13:156-166.

- ⁴¹⁶ Musat M, Korbonits M, Kola B, et al. Enhanced protein kinase B/AKT signaling in pituitary tumors. 11th Congress of the European Neuroendocrine Association, Sorrento, Italy, 2004;Abstract O7.3.
- ⁴¹⁷ Ezzat S, Zheng L, Zhu XF, et al. Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4-recapitulates pituitary tumorigenesis. *J Clin Invest* 2002;109:69-78.
- ⁴¹⁸ Ewing I, Pedder-Smith S, Franchi G, et al. A mutation and expression analyses of the oncogene BRAF in pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66:348-352.
- ⁴¹⁹ Tziortzioti V, Ruebel KH, Kuroki T, et al. Analysis of beta-catenin mutations and alpha-, beta-, and gamma-catenin expression in normal and neoplastic human pituitary tissues. *Endocr Pathol* 2001;12:125-36.
- ⁴²⁰ Xu B, Sano T, Yoshimoto K, Yamada S. Downregulation of E-cadherin and its undercoat proteins in pituitary growth hormone cell adenomas with prominent fibrous bodies. *Endocr Pathol* 2002;13:341-51.
- ⁴²¹ Sano T, Rong QZ, Kagawa N, et al. Down-regulation of E-cadherin and catenins in human pituitary growth hormone-producing adenomas. *Front Horm Res* 2004;32:127-32.
- ⁴²² Oikonomou E, Barreto DC, Soares B, et al. Beta-catenin mutations in craniopharyngiomas and pituitary adenomas. *J Neurooncol* 2005;73:205-9.
- ⁴²³ Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, et al. Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors. *Endocrinology* 2008;149:1235-1242.
- ⁴²⁴ Jordan S, Lidhar K, Korbonits M, et al. Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary. *Eur J Endocrinol* 2000;143:R1-6.
- ⁴²⁵ Gejman R, Batista DL, Zhong Y, et al. Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4119-4125.
- ⁴²⁶ Nomikos P, Ladar C, Fahlbusch R, et al. Impact of primary surgery on pituitary function in patients with non-functioning pituitary adenomas – a study on 721 patients. *Acta Neurochir* 2004;146:27–35.
- ⁴²⁷ Losa M, Mortini P, Barzaghi R, et al. Early results of surgery in patients with nonfunctioning pituitary adenomas and analysis of the risk of tumor recurrence. *J Neurosur* 2008;108:525–532.
- ⁴²⁸ Chang EF, Zada G, Kim S, et al. Long-term recurrence and mortality after surgery and adjuvant radiotherapy for nonfunctional pituitary adenomas. *J Neurosur* 2008;108:736–745.
- ⁴²⁹ Caron P. Clinically non functioning pituitary adenomas and gonadotroph-cell adenomas. *Presse Med* 2009;38:103-106.
- ⁴³⁰ Scheithauer BW, Jaap AJ, Horvath E, et al. Clinically silent corticotroph tumors of the pituitary gland. *Neurosurgery* 2000;47:723–729.
- ⁴³¹ Soto-Ares G, Cortet-Rudelli C, Assaker R, et al. MRI protocol technique in the optimal therapeutic strategy of non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2002;146:179–186.
- ⁴³² Wichers-RotherM, Hoven S, Kristof RA, et al. Non-functioning pituitary adenomas: endocrinological and clinical outcome after transsphenoidal and transcranial surgery. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004;112:323–327.
- ⁴³³ Arafah BM, Prunty D, Ybarra J, et al. The dominant role of increased intrasellar pressure in the pathogenesis of hypopituitarism, hyperprolactinemia, and headaches in patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1789–1793.
- ⁴³⁴ Levy MJ. The association of pituitary tumors and headache. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011;11:164-170.
- ⁴³⁵ Dekkers OM, Pereira AM, Romijn JA. Treatment and follow-up of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3717–3726.
- ⁴³⁶ Greenman Y, Ouaknine G, Veshchev I, et al. Postoperative surveillance of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas: markers of tumour quiescence and regrowth. *Clin Endocrinol* 2003;58:763-769.
- ⁴³⁷ Kim SH, Lee KC, Kim SH. Cranial nerve palsies accompanying pituitary tumor. *J Clin Neuroscience* 2007;14:1158–1162.
- ⁴³⁸ Deepak D, Daousi C, Javadpour M, et al. Macroprolactinomas and epilepsy. *Clin Endocrinol* 2007;66:503–507.
- ⁴³⁹ Dekkers OM, Pereira AM, Roelfsema JHC, et al. Observation alone after transsphenoidal surgery for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1796–1801.

- ⁴⁴⁰ Karavitaki N, Thanabalasingham G, Shore HC, et al. Do the limits of serum prolactin in disconnection hyperprolactinaemia need re-definition? A study of 226 patients with histologically verified non-functioning pituitary macroadenoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:524–529.
- ⁴⁴¹ Schlechte JA. Clinical practice. Prolactinoma. *N Engl J Med* 2003;349:2035–2041.
- ⁴⁴² Arafah BM. Reversible hypopituitarism in patients with large nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:1173–1179.
- ⁴⁴³ Greenman Y, Tordjman K, Kisch E, et al. Relative sparing of anterior pituitary function in patients with growth hormonesecreting macroadenomas: comparison with nonfunctioning macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1577–1583.
- ⁴⁴⁴ Webb SM, Rigla M, Wagner A, et al. Recovery of hypopituitarism after neurosurgical treatment of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3696–3700.
- ⁴⁴⁵ Young WF, Scheithauer BW, Kovacs KT, et al. Gonadotroph adenoma of the pituitary gland: a clinicopathologic analysis of 100 cases. *Mayo Clin Proc* 1996;71:649–656.
- ⁴⁴⁶ Hanson PL, Aylwin SJB, Monson JP, et al. FSH secretion predominates in vivo and in vitro in patients with non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2005;152:363–370.
- ⁴⁴⁷ Chambers EF, Turski PA, LaMasters D, et al. Regions of low density in the contrastenhanced pituitary gland: normal and pathologic processes. *Radiology* 1982;144:109–113.
- ⁴⁴⁸ Elster AD. Modern imaging of the pituitary. *Radiology* 1993;187:1–14.
- ⁴⁴⁹ Freda PU, Wardlaw SL, Post KD. Unusual causes of sellar/parasellar masses in a large transsphenoidal surgical series. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3455–3459.
- ⁴⁵⁰ Naidich MJ, Russell EJ. Current approaches to imaging of the sellar region and pituitary. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:45–79.
- ⁴⁵¹ Powrie JK, Powell M, Ayers AB, et al. Lymphocytic adenohypophysitis: magnetic resonance imaging features of two new cases and a review of the literature. *Clin Endocrinol* 1995;42:315–22.
- ⁴⁵² Doraiswamy PM, Potts JM, Axelson DA, et al. MR assessment of pituitary gland morphology in healthy volunteers: age- and gender-related differences. *Am J Neuroradiol* 1992;13:1295–1299.
- ⁴⁵³ Elster AD, Chen MY, Williams DWD, et al. Pituitary gland: MR imaging of physiologic hypertrophy in adolescence. *Radiology* 1999;174:681–685.
- ⁴⁵⁴ Tsunoda A, Okuda O, Sato K. MR height of the pituitary gland as a function of age and sex: especially physiological hypertrophy in adolescence and in climacterium. *Am J Neuroradiol* 1997;18:551–554.
- ⁴⁵⁵ Chanson P, Daujat F, Young J, et al. Normal pituitary hypertrophy as a frequent cause of pituitary incidentalomas: a follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3009–3015.
- ⁴⁵⁶ Daneshdoost L, Genarelli TA, Bashey HM, et al. Recognition of gonadotroph adenomas in women. *N Engl J Med* 1991;324:589–594.
- ⁴⁵⁷ Somjen D, Tordjman K, Kohen F, et al. Combined β FSH and β LH response to TRH in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol* 1997;46:555–562.
- ⁴⁵⁸ Nobels FRE, KwekkeboomDJ, CoopmanW, et al. A comparison between the diagnostic value of gonadotropins, α -subunits, and chromogranin-A and their response to thyrotropin-releasing hormone in clinically nonfunctioning, α -subunitsecreting, and gonadotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:784–789.
- ⁴⁵⁹ Yoshino A, Katayama Y, Watanabe T, et al. Apoplexy accompanying pituitary adenoma as a complication of preoperative anterior pituitary function tests. *Acta Neurochir* 2007;149:557–565.
- ⁴⁶⁰ Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, et al; Endocrine Society. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:273–288.
- ⁴⁶¹ St-Jean E, Blain F, Comtois R. High prolactin levels may be missed by immunoradiometric assay in patients with macroprolactinomas. *Clin Endocrinol* 1996;44:305–309.
- ⁴⁶² Barkan AL, Chandler WF. Giant pituitary prolactinoma with falsely low serum prolactin: the pitfall of the ‘high-dose hook effect’: case report. *Neurosurgery* 1998;42:913–915.
- ⁴⁶³ Molitch ME. Nonfunctioning pituitary tumors and pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2008;37:151–171.
- ⁴⁶⁴ King JT Jr, Justice AC, Aron DC. Management of incidental pituitary microadenomas: a cost-effectiveness analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3625–3632.
- ⁴⁶⁵ Krikorian A, Aron D. Evaluation and management of pituitary incidentalomas-revisiting an acquaintance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2:138–145.

- ⁴⁶⁶ The Growth Hormone Research Society and Pituitary Society Consensus Conference. Biochemical assessment and long-term monitoring in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3099–3102.
- ⁴⁶⁷ Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5593–5602.
- ⁴⁶⁸ Findling JW, Raff H. Cushing's syndrome: important issues in diagnosis and management. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3746–3753.
- ⁴⁶⁹ Naidich MJ, Russel EJ. Current approaches to imaging of the sellar region and pituitary. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1999;28:45–79.
- ⁴⁷⁰ Rao VJ, James RA, Mitra D. Imaging characteristics of common suprasellar lesions with emphasis on MRI findings. *Clin Radiol* 2008;63:939–947.
- ⁴⁷¹ Reincke M, Allolio B, Saeger J, et al. The 'incidentaloma' of the pituitary gland. Is neurosurgery required? *JAMA* 1990;263:2772–2776.
- ⁴⁷² Donovan LE, Corenblum B. The natural history of pituitary incidentaloma. *Arch Int Med* 1995;155:181–183.
- ⁴⁷³ Sanno N, Oyama K, Tahara S, et al. A survey of pituitary incidentaloma in Japan. *Eur J Endocrinol* 2003;149:123–127.
- ⁴⁷⁴ Dekkers OM, Hammer S, de Keizer RJW, et al. The natural course of non-functioning pituitary macroadenomas. *Eur J Endocrinol* 2007;156:217–224.
- ⁴⁷⁵ Arita K, Tominaga A, Sugiyama K, et al. Natural course of incidentally found nonfunctioning pituitary adenoma, with special reference to pituitary apoplexy during follow-up examination. *J Neurosurg* 2006;104:884–891.
- ⁴⁷⁶ Karavitaki N, Collison K, Halliday J, et al. What is the natural history of nonoperated nonfunctioning pituitary adenomas? *Clin Endocrinol* 2007;67:938–943.
- ⁴⁷⁷ Feldkamp J, Santen R, Harms E, et al. Incidentally discovered pituitary lesions: high frequency of macroadenomas and hormone-secreting adenomas—results of a prospective study. *Clin Endocrinol* 1999;51:109–113.
- ⁴⁷⁸ Chandler WF, Barkan AL. Treatment of pituitary tumors: a surgical perspective. *Endoc Clin N Am* 2008;37:51–66.
- ⁴⁷⁹ Ahmed S, Elsheikh M, Stratton IM, et al. Outcome of transphenoidal surgery for acromegaly and its correlation to surgical experience. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;50:557–559.
- ⁴⁸⁰ Ciric I, Ragin A, Baumgartner C, et al. Complications of transsphenoidal surgery: results of a national survey, review of literature, and personal experience. *Neurosurgery* 1997;40:225–236.
- ⁴⁸¹ Ludecke DK, Abe T. Transsphenoidal microsurgery for newly diagnosed acromegaly: a personal view after more than 1,000 operations. *Neuroendocrinology* 2006;83:230–239.
- ⁴⁸² Shimon I, Cohen ZR, Ram Z, et al. Transsphenoidal surgery for acromegaly: endocrinological follow-up of 98 patients. *Neurosurgery* 2001;48:1239–1245.
- ⁴⁸³ Chen L, White WL, Spetzler RF, et al. A prospective study of nonfunctioning pituitary adenomas: presentation, management, and clinical outcome. *J Neurooncol* 2011;102:129–38.
- ⁴⁸⁴ Black PM, Zervas NT, Candia G. Management of large pituitary adenomas by transsphenoidal surgery. *Surg Neurol* 1988;29:443–447.
- ⁴⁸⁵ Ferrante E, Ferraroni M, Castrignano T, et al. Non-functioning pituitary adenoma database: a useful resource to improve the clinical management of pituitary tumors. *Eur J Endocrinol* 2006;155:823–829.
- ⁴⁸⁶ Zhang X, Fein Z, Zhang J, et al. Management of nonfunctioning pituitary adenomas with suprasellar extensions by transsphenoidal microsurgery. *Surg Neurol* 1999;52:380–385.
- ⁴⁸⁷ Park P, Chandler W, Barkan A, et al. The role of radiation therapy after surgical resection of nonfunctional pituitary macroadenomas. *Neurosurgery* 2004;55:100–106.
- ⁴⁸⁸ Honneger J, Ernemann U, Psaras T, et al. Objective criteria for successful transsphenoidal removal of suprasellar nonfunctioning pituitary adenomas. A prospective study. *Acta Neurochirurgica (Wien)* 2007;149:21–29.
- ⁴⁸⁹ Jakobsson KE, Petruson B, Lindblom B. Dynamics of visual improvement following chiasmal decompression. Quantitative pre- and postoperative observations. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80:512–516.
- ⁴⁹⁰ Kerrison JB, Lynn MJ, Baer CA, et al. Stages of improvement in visual fields after pituitary tumor resection. *Am J Ophthalmol* 2000;130:813–820.

- ⁴⁹¹ Dekkers OM, de Keizer RJ, Roelfsema F, et al. Progressive improvement of impaired visual acuity during the first year after transsphenoidal surgery for non-functioning pituitary macroadenoma. *Pituitary* 2007;10:61–65.
- ⁴⁹² Gnanalingham KK, Bhattacharjee S, Pennington R, et al. The time course of visual field recovery following transphenoidal surgery for pituitary adenomas: predictive factors for a good outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:415–419.
- ⁴⁹³ Webb SM, Rigla M, Wagner A, et al. Recovery of hypopituitarism after neurosurgical treatment of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3696–3700.
- ⁴⁹⁴ Ciric I, Ragin A, Baumgartner C, et al. Complications of transsphenoidal surgery: results of a national survey, review of the literature and personal experience. *Neurosurgery* 1997;40:225–236.
- ⁴⁹⁵ Barker FG, Klibanski A, Swearingen B. Transsphenoidal surgery for pituitary tumors in the United States, 1996–2000: mortality, morbidity, and the effects of hospital and surgeon volume. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4709–4719.
- ⁴⁹⁶ Nemergut EC, Zuo Z, Jane JÁ, et al. Predictors of diabetes insipidus after transsphenoidal surgery: a review of 881 patients. *J Neurosurg* 2005;103:448–454.
- ⁴⁹⁷ Comtois R, Beauregard H, Somma M, et al. The clinical and endocrine outcome to trans-sphenoidal microsurgery of nonsecreting pituitary adenomas. *Cancer* 1991;68:860–866.
- ⁴⁹⁸ Pia HW, Grote E, Hildebrandt G. Giant pituitary adenomas. *Neurosurg Rev* 1985;8:207–220.
- ⁴⁹⁹ Mohr G, Hardy J, Comtois R, et al. Surgical management of giant pituitary adenomas. *Can J Neurol Sci* 1990;17:62–66.
- ⁵⁰⁰ Cardoso ER, Peterson EW. Pituitary apoplexy: a review. *Neurosurgery* 1984;14:363–373.
- ⁵⁰¹ Ayuk J, McGregor EJ, Mitchell RD, et al. Acute management of pituitary apoplexy—surgery or conservative management? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:747–752.
- ⁵⁰² Elsasser Imboden PN, De Tribolet N, Lobrinus A, et al. Apoplexy in pituitary macroadenoma: eight patients presenting in 12 months. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:188–196.
- ⁵⁰³ Randeve HS, Schoebel J, Byrne J, et al. Classical pituitary apoplexy: clinical features, management and outcome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51:181–188.
- ⁵⁰⁴ Sibal L, Ball SG, Connolly V, et al. Pituitary apoplexy: a review of clinical presentation, management and outcome in 45 cases. *Pituitary* 2004;7:157–163.
- ⁵⁰⁵ Kremmer P, Forsting M, Ranaei G, et al. Magnetic resonance imaging after transsphenoidal surgery of clinically nonfunctional pituitary macroadenomas and its impact on detecting residual adenoma. *Acta Neurochir (Wien)* 2002;144:433–443.
- ⁵⁰⁶ Kontogeorgos G. Predictive markers of pituitary adenoma behavior. *Neuroendocrinology* 2006;83:179–188.
- ⁵⁰⁷ Thapar K, Kovacs K, Scheithauer B, et al. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the MIB-1 antibody. *Neurosurgery* 1996;38:99–107.
- ⁵⁰⁸ Mastronardi L, Guiducci A, Spera C, et al. Ki-67 labelling index and invasiveness among anterior pituitary adenomas: analysis of 103 cases using the MIB-1 monoclonal antibody. *J Clin Pathol* 1999;52:107–111.
- ⁵⁰⁹ Honegger J, Prettin C, Feuerhake F, et al. Expression of Ki-67 antigen in nonfunctioning pituitary adenomas: correlation with growth velocity and invasiveness. *J Neurosurg* 2003;99:674–679.
- ⁵¹⁰ Brada M, Jankowska P. Radiotherapy for Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2008;37:263–275.
- ⁵¹¹ Rocher FP, Sentenac I, Berger C, et al. Stereotactic radiosurgery: the Lyon experience. *Acta Neurochir Wien* 1995;63:109–114.
- ⁵¹² Brada M, Rajan B, Traish D, et al. The long term efficacy of conservative surgery and radiotherapy in the control of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;38:571–578.
- ⁵¹³ Halberg FE, Sheline GE. Radiotherapy of pituitary tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987;16:667–684.
- ⁵¹⁴ Flickinger JC, Nelson PB, Martinez AJ, et al. Radiotherapy of nonfunctional adenomas of the pituitary gland. Results with long-term follow-up. *Cancer* 1989;63:2409–2414.
- ⁵¹⁵ Tsang RW, Brierley JD, Panzarella T, et al. Role of radiation therapy in clinical hormonally active pituitary adenomas. *Radiother Oncol* 1996;41:45–53.
- ⁵¹⁶ Breen P, Flickinger JC, Kondziolka D, et al. Radiotherapy for nonfunctional pituitary adenoma: analysis of long-term tumor control. *J Neurosurg* 1998;89:933–938.

- ⁵¹⁷ Grigsby P, Stokes S, Marks J, et al. Prognostic factors and results of radiotherapy alone in the management of pituitary adenoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;15:1103–1110.
- ⁵¹⁸ Gittoes NJ, Bates AS, Tse W, et al. Radiotherapy for non-function pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48:331–337.
- ⁵¹⁹ Biermasz NR, Dulken HV, Roelfsema F. Postoperative radiotherapy in acromegaly is effective in reducing GH concentration to safe levels. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;53:321–327.
- ⁵²⁰ Estrada J, Boronat M, Mielgo M, et al. The long-term outcome of pituitary irradiation after unsuccessful transsphenoidal surgery in Cushing's disease. *N Engl J Med* 1997;336:172–177.
- ⁵²¹ Peace KA, Orme SM, Sebastian JP, et al. The effect of treatment variables on mood and social adjustment in adult patients with pituitary disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46:445–450.
- ⁵²² van Beek AP, van den Bergh AC, van den Berg LM, et al. Radiotherapy is not associated with reduced quality of life and cognitive function in patients treated for nonfunctioning pituitary adenoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:986–991.
- ⁵²³ Brada M, Ford D, Ashley S, et al. Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma. *Br Med J* 1992;304:1343–1346.
- ⁵²⁴ Minniti G, Traish D, Ashley S, et al. Risk of second brain tumor after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma: update after an additional 10 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:800–804.
- ⁵²⁵ Tsang R, Laperriere N, Simpson W, et al. Glioma arising after radiation therapy for pituitary adenoma: a report of four patients and estimation of risk. *Cancer* 1993;72:2227–2233.
- ⁵²⁶ Erfurth EM, Bulow B, Mikoczy Z, et al. Incidence of a second tumor in hypopituitary patients operated for pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:659–662.
- ⁵²⁷ Brada M, Ashley S, Ford D, et al. Cerebrovascular mortality in patients with pituitary adenoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57:713–717.
- ⁵²⁸ Brada M, Burchell L, Ashley S, et al. The incidence of cerebrovascular accidents in patients with pituitary adenoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:693–698.
- ⁵²⁹ Tomlinson JW, Holden N, Hills RK, et al. Association between premature mortality and hypopituitarism. West Midlands Prospective Hypopituitary Study Group. *Lancet* 2001;357:425–431.
- ⁵³⁰ Erfurth EM, Bulow B, Hagmar LE. Is vascular mortality increased in hypopituitarism? *Pituitary* 2000;3:77–81.
- ⁵³¹ Flickinger JC, Deutsch M, Lunsford LD. Repeat megavoltage irradiation of pituitary and suprasellar tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;17:171–175.
- ⁵³² Schoenthaler R, Albright NW, Wara WM, et al. Re-irradiation of pituitary adenoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;24:307–314.
- ⁵³³ Erfurth EM, Bulow B, Svahn-Tapper G, et al. Risk factors for cerebrovascular deaths in patients operated and irradiated for pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4892–4899.
- ⁵³⁴ Minniti G, Traish D, Ashley S, et al. Risk of second brain tumor after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenomas; update after an additional 10 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:800–804.
- ⁵³⁵ Tomlinson JW, Holden N, Hills RK, et al. Association between premature mortality and hypopituitarism, West Midlands prospective hypopituitary study group. *Lancet* 2001;357:425–431.
- ⁵³⁶ Tsang RW, Brierley JD, Panzarella T, et al. Radiation therapy for pituitary adenoma: treatment outcome and prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Physics* 1994;30:557–565.
- ⁵³⁷ Sheehan JP, Kondziolka D, Flickinger J, et al. Radiosurgery for residual or recurrent nonfunctioning pituitary adenoma. *J Neurosurg* 2002;97(Suppl. 5):408–414.
- ⁵³⁸ Grossman A, Ross R, Charlesworth M, et al. The effect of dopamine agonist therapy on large functionless pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1985;22:679–686.
- ⁵³⁹ Bevan JS, Burke CW. Non-functioning pituitary adenomas do not regress during bromocriptine therapy but possess membrane-bound dopamine receptors which bind bromocriptine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1986;25:561–572.
- ⁵⁴⁰ Bevan JS, Webster J, Burke CW, Scanlon MF. Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage. *Endocr Rev* 1992;13:220–240.
- ⁵⁴¹ Ferone D, Gatto F, Arvigo M, et al. The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol* 2009;42:361–370.

- ⁵⁴² Renner U, Mojto J, Lange M, et al. Effect of bromocriptine and SMS 201-995 on growth of human somatotrophic and non-functioning pituitary adenoma cells in vitro. *Eur J Endocrinol* 1994;130:80–89.
- ⁵⁴³ Colao A, Pivonello R, Di Somma C, et al. Medical therapy of pituitary adenomas: effects on tumor shrinkage. *Rev Endocr Metab Disord* 2009;10:111–123.
- ⁵⁴⁴ Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endoc Rev* 2006;27:485–534.
- ⁵⁴⁵ Beck-Peccoz P, Persani L. Medical management of thyrotropinsecreting pituitary adenomas. *Pituitary* 2002;5:83–88.
- ⁵⁴⁶ Ness-Abramof R, Ishay A, Harel G, et al. TSH-secreting pituitary adenomas: follow-up of 11 cases and review of the literature. *Pituitary* 2007;10:307–310.
- ⁵⁴⁷ Freda PU. Somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3013–3018.
- ⁵⁴⁸ Burt MG, Ho KKY. Newer options in the management of acromegaly. *Int Med J* 2006;36:437–444.
- ⁵⁴⁹ Pivonello R, Matrone C, Filippella M, et al. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1674–1683.
- ⁵⁵⁰ Kwekkeboom DJ, Hofland LJ, van Koetsveld PM, et al. Bromocriptine increasingly suppresses the in vitro gonadotropin and alpha-subunit release from pituitary adenomas during long term culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:718–724.
- ⁵⁵¹ Kwekkeboom DJ, Lamberts SW. Lon-term treatment with the dopamine agonist CV 205-502 of patients with clinically non-functioning, gonadotroph, or alpha-subunit secreting pituitary adenoma. *Clin Endocrinol* 1992;36:171–176.
- ⁵⁵² Bevan JS, Burke CW. Non-functioning pituitary adenomas do not regress during bromocriptine therapy but possess membrane-bound dopamine receptors which bind bromocriptine. *Clin Endocrinol* 1986;25:561–572.
- ⁵⁵³ Colao A, Di Somma C, Pivonello R, et al. Medical therapy for clinically non-functioning pituitary adenomas. *Endoc Relat Cancer* 2008;15:905–915.
- ⁵⁵⁴ Greenman Y, Tordjman K, Osher E, et al. Postoperative treatment of clinically nonfunctioning pituitary adenomas with dopamine agonists decreases tumour remnant growth. *Clin Endocrinol* 2005;63:39–394.
- ⁵⁵⁵ Zanettini R, Antonini A, Gatto G, et al. Valvular heart disease and the use of dopamine agonists for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2007;356:39–46.
- ⁵⁵⁶ Lancellotti P, Livadariu E, Markov M, et al. Cabergoline and the risk of valvular lesions in endocrine disease. *Eur J Endocrinol* 2008;159:1–5.
- ⁵⁵⁷ Valassi et al. Dopamine agonists and valvulopathy in hyperprolactinemia *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:1025–1033
- ⁵⁵⁸ Greenman Y, Melmed S. Expression of three somatostatin receptor subtypes in pituitary adenomas: evidence for preferential SSTR5 expression in the mammosomatotroph lineage. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:724–729.
- ⁵⁵⁹ Taboada GF, Luque RM, Bastos W, et al. Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 2007;156:65–74.
- ⁵⁶⁰ Pawlikowski M, Lawnicka H, Pisarek H, et al. Effects of somatostatin-14 and the receptor specific somatostatin analogs on chromogranin A and alpha-subunit (alpha-SU) release from 'clinically nonfunctioning' pituitary adenoma cells incubated in vitro. *J Physiol Pharmacol* 2007;58:179–188.
- ⁵⁶¹ Florio T, Thellung S, Arena S, et al. Somatostatin and its analog lanreotide inhibit the proliferation of dispersed human non-functioning pituitary adenoma cells in vitro. *Eur J Endocrinol* 1999;141:396–408.
- ⁵⁶² Zatelli MC, Piccin D, Bottoni A, et al. Evidence for differential effects of selective somatostatin receptor subtype agonists on α -subunit and chromogranin-A secretion and on cell viability in human nonfunctioning pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5181–5188.
- ⁵⁶³ Zatelli MC, Piccin D, Vignalli C, et al. Pasireotide, a multiple somatostatin receptor subtypes ligand, reduces cell viability in non-functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion. *Endoc Relat Cancer* 2007;14:91–102.
- ⁵⁶⁴ McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4238–4244.

- ⁵⁶⁵ Luciani P, Gelmini S, Ferrante E, et al. Expression of the antiapoptotic gene seladin-1 and octreotide-induced apoptosis in growth hormone-secreting and nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6156-6161.
- ⁵⁶⁶ Pagotto U, Arzberger T, Ciani E, et al. Inhibition of Zac1, a new gene differentially expressed in the anterior pituitary, increases cell proliferation. *Endocrinology* 1999;140:987-996.
- ⁵⁶⁷ Theodoropoulou M, Zhang J, Laupheimer S, et al. Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing Zac1 expression. *Cancer Res* 2006;66:1576-1582.
- ⁵⁶⁸ Barz T, Hoffmann A, Panhuysen M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a Zac target gene mediating Zac antiproliferation. *Cancer Res* 2006;66:11975-1982.
- ⁵⁶⁹ Emery MN, Leontiou C, Bonner SE, et al. PPAR-gamma expression in pituitary tumours and the functional activity of the glitazones: evidence that any anti-proliferative effect of the glitazones is independent of the PPAR-gamma receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:389-395
- ⁵⁷⁰ Rocheville M, Lange DC, Kumar U, et al. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 2000;288:154-157.
- ⁵⁷¹ Florio T, Barbieri F, Spaziante R, et al. Efficacy of a dopamine-somatostatin chimeric molecule, BIM-23A760, in the control of cell growth from primary cultures of human non-functioning pituitary adenomas: a multi-center study. *Endoc Relat Cancer* 2008;15:583-596.
- ⁵⁷² Andersen M, Bjerre P, Henrik D, et al. In vivo secretory potential and the effect of combination therapy with octreotide and cabergoline in patients with clinically non-functioning pituitary adenomas. *Clin Endocrinol* 2001;54:23-30.
- ⁵⁷³ Figlin RA, Brown E, Armstrong AJ, et al. NCCN Task Force Report: mTOR inhibition in solid tumors. *J Natl Compr Canc Netw* 2008;6:S1-S20.
- ⁵⁷⁴ Yao JC, Phan AT, Chang DZ, et al. Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low- to intermediate-grade neuroendocrine tumors: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2008;26:4311-4318.
- ⁵⁷⁵ Bohm A, Aichberger KJ, Mayerhofer M, et al. Targeting of mTOR is associated with decreased growth and decreased VEGF expression in acute myeloid leukaemia cells. *Eur J Clin Invest* 2009;39:395-405.
- ⁵⁷⁶ McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, et al. Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4238-4244.
- ⁵⁷⁷ Yamada S, Takada K. Angiogenesis in pituitary adenomas. *Microsc Res Tech* 2003;60:236-243.
- ⁵⁷⁸ Gorshtein A, Rubinfeld H, Kandler E, et al. mTOR inhibitors rapamycin and RAD001 (Everolimus) induce antiproliferative effects in GH-secreting pituitary tumor cells in vitro. *Endocr Relat Cancer* 2009;16:1017-1027.
- ⁵⁷⁹ Zatelli MC, Minoia M, Filieri C, et al. Everolimus on cell viability in nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:968-976.
- ⁵⁸⁰ Cerovac V, Monteserin-Garcia J, Rubinfeld H, et al. The somatostatin analogue octreotide confers sensitivity to rapamycin treatment on pituitary tumor cells. *Cancer Res* 2010;70:666-674.
- ⁵⁸¹ Grossman A. Treatment of pituitary tumors. Oral presentation ENEA 2010.
- ⁵⁸² Raverot G, Sturm N, Fraipont de F, et al. Temozolamide treatment in aggressive pituitary tumors and pituitary carcinomas: a French multicenter Study. *J Clin Endocrin Metab* 2010;95:4592-4599.
- ⁵⁸³ Kurzen H, Schimtt S, Naher H, et al. Inhibition of angiogenesis by non-toxic doses of temozolamide. *Anticancer Drugs* 2003;14:515-522.
- ⁵⁸⁴ Van Aken MO, Lamberts SW. Diagnosis and Treatment of Hypopituitarism: An Update. *Pituitary* 2005;8:183-191.
- ⁵⁸⁵ Dekkers OM, van der Klaauw AA, Pereira AM, et al. Quality of life is decreased after treatment for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3364-3369.
- ⁵⁸⁶ Van der Klaauw AA, Kars M, Biermasz NR, et al. Disease-specific impairments in quality of life during long-term followup of patients with different pituitary adenomas. *Clin Endocrinol* 2008;69:775-784.
- ⁵⁸⁷ Page RC, Hammersley MS, Burke CW, et al. An account of the quality of life of patients after treatment for non-functioning pituitary tumours. *Clin Endocrinol* 1997;46:401-406.
- ⁵⁸⁸ Van Beek AP, van den Bergh ACM, van den Berg LM, et al. Radiotherapy is not associated with reduced quality of life and cognitive function in patients treated for nonfunctioning pituitary adenoma. *Int J of Radiat Oncol Biol Physics* 2007;68:986-991.

- ⁵⁸⁹ Romijn JA, Smit JW, Lamberts SW. Intrinsic imperfections of endocrine replacement therapy. *Eur J Endocrinol* 2003;149:91–97.
- ⁵⁹⁰ Lindholm J, Nielsen H, Bjerre P, et al. Hypopituitarism and mortality in pituitary adenomas. *Clin Endocrinol* 2006;65:51–58.
- ⁵⁹¹ Van den Bergh AC, van den BG, Schoorl MA, et al. Immediate postoperative radiotherapy in residual nonfunctioning pituitary adenoma: beneficial effect on local control without negative impact on pituitary function and life expectancy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:863–869.
- ⁵⁹² Dekkers OM, Pereira AM, Romjin JA. Treatment and follow-up of clinically nonfunctioning pituitary macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3717–3726.
- ⁵⁹³ Naidich MJ, Russell EJ. Current approaches to imaging of the sellar region and pituitary. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:45–79.
- ⁵⁹⁴ Kaltsas GA, Nomikos P, Kontogeorgos G, et al. Diagnosis and management of pituitary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3089–3099.
- ⁵⁹⁵ Agundez JA, Rodriguez I, Olivera M, et al. CYP2D6, NAT2 and CYP2E1 genetic polymorphisms in nonagenarians. *Age Ageing* 1997 26 147–151.
- ⁵⁹⁶ Muiras ML, Verasdonck P, Cottet F, et al. Lack of association between human longevity and genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes at the NAT2, GSTM1 and CYP2D6 loci. *Hum Genet* 199;102:526–532.
- ⁵⁹⁷ Wolf CR, Dale CA, Smith CA, et al. Relationship between the debrisoquine hydroxylase polymorphism and cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1992;1:1035–1038.
- ⁵⁹⁸ Lemos MC, Cabrita FJ, Silva HA, et al. Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. *Carcinogenesis* 1999;20:1225–1229.
- ⁵⁹⁹ Suhardja AS, Kovacs KT, Rutka JT. Molecular pathogenesis of pituitary adenomas: a review. *Acta Neurochir (Wien)* 1999;141:729–36.
- ⁶⁰⁰ Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, et al. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993;14:1821–1824.
- ⁶⁰¹ Laso N, Lafuente MJ, Mas S, et al. Glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1)-dependent risk for colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3399–3403.
- ⁶⁰² Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, et al. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300:271–276.
- ⁶⁰³ Kasuki Jomori de Pinho L, Vieira Neto L, Armondi Wildemberg LE, et al. Low aryl hydrocarbon receptor-Interacting protein expression is a better marker of invasiveness in somatotropinomas than Ki-67 and p53. *Neuroendocrinology* 2011;94:39–48.
- ⁶⁰⁴ Karavitaki N, Collison K, Halliday J, et al. What is the natural history of nonoperated nonfunctioning pituitary adenomas? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67:938–943.
- ⁶⁰⁵ MacGregor EA. Prevention and treatment of menstrual migraine. *Drugs* 2010;70:1799–1818.
- ⁶⁰⁶ Victor TW, Hu X, Campbell JC, et al. Migraine prevalence by age and sex in the United States: a life-span study. *Cephalalgia* 2010;30:1065–1072.
- ⁶⁰⁷ Oruçkaptan HH, Senmevsim O, Ozcan OE. Pituitary adenomas: results of 684 surgically treated patients and review of the literature. *Sur Neurol* 2000;53:211–219.
- ⁶⁰⁸ Gittoes N, Bates AS, Tse W, et al. Radiotherapy for nonfunctioning pituitary tumors. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48:331–337.
- ⁶⁰⁹ Turner HE, Stratton IM, Byrne JV, et al. Audit of selected patients with nonfunctioning pituitary adenomas treated without irradiation—a follow-up study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51:281–284.
- ⁶¹⁰ Melmed S. Pathogenesis of pituitary tumors. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:257–66.
- ⁶¹¹ Kaprio J. Genetic epidemiology. *BMJ* 2000;320:1257–1259.
- ⁶¹² Perera FP, Weinstein IB. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 2000;21:517–524.
- ⁶¹³ Lemos MC. Genes de metabolismo de genotóxicos e susceptibilidade para neoplasias hematológicas. In *Dissertação de Mestrado*. Universidade de Coimbra, 2002.
- ⁶¹⁴ Laso N, Lafuente MJ, Mas S, et al. Glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1)-dependent risk for colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3399–3403.
- ⁶¹⁵ Morari EC, Leite JL, Granja F, et al. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1485–1488.

- ⁶¹⁶ Stucker I, Hirvonen A, de Waziers I, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2002;23:1475-1481.
- ⁶¹⁷ Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, et al. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer* 2002;180:165-171.
- ⁶¹⁸ Lee KM, Park SK, Kim SU, et al. N-acetyltransferase (NAT1, NAT2) and glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1) polymorphisms in breast cancer. *Cancer* 2003;196:179-186.
- ⁶¹⁹ Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128:674-680.
- ⁶²⁰ Morari EC, Leite JL, Granja F, et al. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1485-1488.
- ⁶²¹ Smith G, Stanley LA, Sim E, et al. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. *Cancer Surv* 1995;25:27-65.
- ⁶²² Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996;15:273-280.
- ⁶²³ Hernandez A, Cespedes W, Xamena N, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms in thyroid cancer patients. *Cancer* 2003;190:37-44.
- ⁶²⁴ Marez D, Legrand M, Sabbagh N, et al. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 1997;7:193-202.
- ⁶²⁵ Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997;60:284-295.
- ⁶²⁶ Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1239-48.
- ⁶²⁷ Vandeva S, Jaffrain-Rea ML, Daly AF, et al. The genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24:461-476.
- ⁶²⁸ Herman V, Fagin J, Gonsky R, et al. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1427-1433.
- ⁶²⁹ Georgitsi, Raitila A, Karhu A, et al. Molecular diagnosis of pituitary adenoma predisposition caused by aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene mutations. *PNAS* 2007;104:4101-4105.
- ⁶³⁰ Yu R, Bonert V, Saporta I, Raffel LJ, Melmed S. Aryl hydrocarbon receptor interacting protein variants in sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:5126-5129.
- ⁶³¹ Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, et al. The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66(4):499-502.
- ⁶³² Korbonits M, *Hormones* 2006;5(Suppl 1):30 (oral presentation).
- ⁶³³ Tichomirowa MA, Daly AF, Barlier A, et al. High incidence of AIP mutations in sporadic pituitary adenomas in young patients with macroadenomas. [OR39-5] *Endocrine Society 91st Annual Meeting*, June 10-13, 2009.
- ⁶³⁴ Jaffrain-Rea ML, Angelini M, Gargano D, et al. Expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-interaction protein in pituitary adenomas: pathological and clinical implications. *Endoc Related Cancer* 2009;16:1029-1043.

