

A.I.P.Vet.

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

AIPVet

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

I Congresso Nazionale



con la partecipazione

della Società Italiana di Patologia Tossicologica e Sperimentale

del Gruppo di Patologia Clinica Veterinaria

del Gruppo Veterinario di Analisi di Immagine

**Palazzo Feltrinelli, Gargnano (BS),
30 Aprile-1 Maggio 2004**

OSSERVAZIONI ISTOCHEMICHE E IMMUNOISTOCHEMICHE SULL'IPOFISI ANTERIORE DI UN CANE AFFETTO DA MALATTIA DI CUSHING

*Stefano Rocca, Salvatore Pirino, Elisabetta Antuofermo, Stefania Idili, Gabriella Casula,
Antonica Mura, Antonio Leoni

Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria – *Istituto di Anatomia e Istologia Patologica, Facoltà di Medicina – Università degli Studi di Sassari

Riassunto

Gli adenomi del lobo anteriore dell'ipofisi sono neoplasie benigne piuttosto frequenti. Essi mostrano aspetto circoscritto e accrescimento non invasivo nei confronti dei tessuti circostanti. Il tumore a cellule secernenti ACTH, che colpisce le cellule cromofobe della pars anteriore dell'ipofisi, è uno di questi e viene associato alla sindrome di Cushing, causando evidente ipercortisolemia per stimolazione della corteccia surrenale. Un cane meticcio, femmina, di 7 anni, in terapia per sospetta Sindrome di Cushing e pervenuto a morte, è stato sottoposto ad accurato esame necroscopico, durante il quale si procedeva tra l'altro a prelevare ghiandole surrenali, polmone, fegato, cute, muscoli e intera ghiandola pituitaria. Su detti organi veniva eseguito l'esame istopatologico per la ricerca delle lesioni tipiche determinate dalla sindrome. Sulla ghiandola pituitaria, aumentata notevolmente di volume, venivano eseguite indagini istopatologiche specifiche, mediante colorazione OFG, per differenziare gli istotipi costituenti la pars anteriore. Tale colorazione ha consentito di riscontrare e identificare tra le cellule pituitarie gli elementi acidofili, basofili e cromofobi; queste ultime cellule, aumentate di numero, erano d'aspetto omogeneo e formavano un nucleo compatto e con scarso stroma al centro della ghiandola. La caratterizzazione cromatica e la differenziazione dai restanti istotipi ha reso possibile identificare la neoplasia come adenoma ipofisario di tipo "diffuso", caratterizzato per l'appunto da cellule disposte a strati, con scarso stroma e debole vascolarizzazione. Per verificare l'ormonoattività delle cellule neoplastiche si è proceduto all'esame immunoistochimico per la ricerca dell'ACTH. Il risultato di tale indagine ha dato esito positivo, confermando l'intensa attività secernente delle cellule oggetto di studio.

Parole chiave: Ipofisi Anteriore, Surrenali, Cellule Cromofobe, ACTH

Summary

Histochemical and immunohistochemical observations in anterior pituitary gland of a dog affected by cushing disease. Functional tumors in the pituitary gland are benign neoplasms most commonly in the dog. They are derived from corticotroph cells (ACTH-secreting) in pars distalis and intermedia and associated with a clinical syndrome of cortisol excess (Cushing's like disease). We report the histologic, histochemical and immunohistochemical features of a pituitary gland in Cushing disease in one bitch of 7 years old. The neoplasm appeared well differentiated with numerous chromophobe cells with aspect of diffuse adenoma type. The anti-ACTH antibody are used to verified the ormono activity of neoplasm.

Key Word: Anterior Pituitary gland, Adrenal gland, Chromophobe cells, ACTH

Introduzione

I tumori a carico dell'ipofisi in genere si caratterizzano per dei quadri disendocrini piuttosto gravi.

Tali quadri sono dovuti o a fenomeni di compressione e alterazione dei parenchimi adiacenti la neoplasia (ipotalamo e altre parti della stessa ghiandola) o per una conservata capacità secretoria nelle cellule che costituiscono lo stesso tumore, il quale sfugge ai normali meccanismi di feedback dell'organismo. Inoltre si ricorda che i tumori a carico della porzione anteriore dell'ipofisi, sono prevalentemente adenomi e possono essere formati in genere: da cellule cromofobe (adenoma funzionale a cellule cromofobe ACTH secernente, frequente nel cane),

da cellule acidofile (adenoma funzionale a cellule acidofile GH o PRL secernente, frequente nell'uomo e raro nei nostri animali), mentre sono di raro riscontro neoplasie come l'adenoma delle cellule basofile e il carcinoma delle cellule cromofobe. Com'è noto, gli ormoni che sono liberati da questa ghiandola sono prodotti da sottopopolazioni cellulari differenti. Essenzialmente nella ghiandola pituitaria anteriore si ritrovano principalmente tre istotipi, classificabili in base alle loro affinità tintoriali: cellule cromofile acidofile (GH+, PRL+); cellule cromofile basofile (TSH+, ACTH+, LH+, FSH+) e cellule cromofobe (ritenute forme quiescenti e degranulate delle cellule cromofile). La caratterizzazione di tali istotipi dal punto di vista morfo-istochimico nell'ambito neoplastico trova ancora una vasta applicazione, ma si è rivelato un sistema del tutto superato ed inadeguato, poiché non si riesce a stabilire con certezza un orientamento preciso sulle cellule coinvolte e la loro attività armono-secernente. A tale riguardo, le metodiche di immunoistochimica permettono di avere degli ulteriori contributi che possono rendere più chiari dei quadri altrimenti di difficile classificazione, in relazione soprattutto all'attività che le cellule neoplastiche possono avere nell'ambito di patologia complesse come l'iperadrenocortisolemia.

Materiali e metodi

Oggetto del nostro studio è stato un cane meticcio femmina ovario-isterectomizzata di sette anni, in cura presso una struttura veterinaria privata per sospetta malattia di Cushing. L'animale è stato sottoposto ad eutanasia dopo circa un anno di terapia a seguito di una grave crisi dispnoica. Sul cadavere sono stati eseguiti i seguenti accertamenti:

Esame anatomico-istopatologico per confermare le lesioni tipiche da ipercortisolemia;

Esame istopatologico specifico dell'ipofisi per differenziare gli istotipi che caratterizzano la porzione anteriore della ghiandola pituitaria e l'origine delle cellule neoplastiche;

Confermare l'ormonoattività della neoplasia mediante tecnica immunoistochimica per l'ormone adrenocorticotropo.

Esame anatomopatologico: È stato eseguito l'esame esterno del cadavere, della cute e delle

masse muscolari, inoltre sono stati controllati gli organi interni con particolare attenzione alle ghiandole surrenali e alla ghiandola pituitaria che è stata asportata in toto.

Esame istopatologico: i campioni sono stati fissati in formalina tamponata la 10%, inclusi in paraffina e sezionati ad uno spessore di 3 µm. le sezioni sono state colorate con ematossilina e eosina, PAS e con il metodo OFG (*Slidders 1961*). In particolare quest'ultima colorazione permette di differenziare in giallo le cellule acidofile, in rosso-magenta le cellule basofile e in blu-grigio le cellule cromofobe). Tale metodica prevede i seguenti passaggi:

colorazione dei nuclei mediante ematossilina

differenziazione in alcool-acido

colorazione con orange G

colorazione con fucsina acida

un trattamento con acido fosforotungstico

colorazione con verde luce

Esame immunoistochimico: Le sezioni per immunoistochimica, sezionate ad uno spessore di 3 µm, sono state montate su vetrini pretrattati con 3-aminopropyl-triethoxylane. Dopo lo sparaffinamento si è proceduto allo smascheramento degli antigeni con due trattamenti medianate forno a microonde a 750W per 4' ciascuno in tampone citrato pH 6.0, evitando l'over-riscaldamento del tampone stesso. Le sezioni sono state poi incubate con l'anticorpo monoclonale anti-ACTH a una diluizione di 1:75 (Dako, clone 02A3) o/n. Per la reazione di rivelazione si è usato il kit Immunoperoxidase LAB/Probe Kit Streptavidina-biotina che utilizza come cromogeno la diaminobenzidina.

Risultati

Esame anatomopatologico: All'esame macroscopico del cadavere, sono state riscontrate lesioni tipiche riconducibile ad una ipercortisolemia con aree alopeciche simmetriche. Esteriormente si osservava assottigliamento della cute e calcificazioni cutanee. A carico degli organi interni si segnalavano inoltre calcificazioni a carico del polmone il quale non collassava dopo l'apertura del torace ed appariva congesto e aumentato di peso e di volume, mentre sul cuore si osservava una grave endocardiosi valvolare a livello della valvola atrioventricolare di destra. Le ghiandole surrenali si presentavano ipertrofiche

con una superficie ricca di nodulini, mentre l'ipofisi appariva anch'essa aumentata di volume e di forma irregolare a livello della sua porzione anteriore.

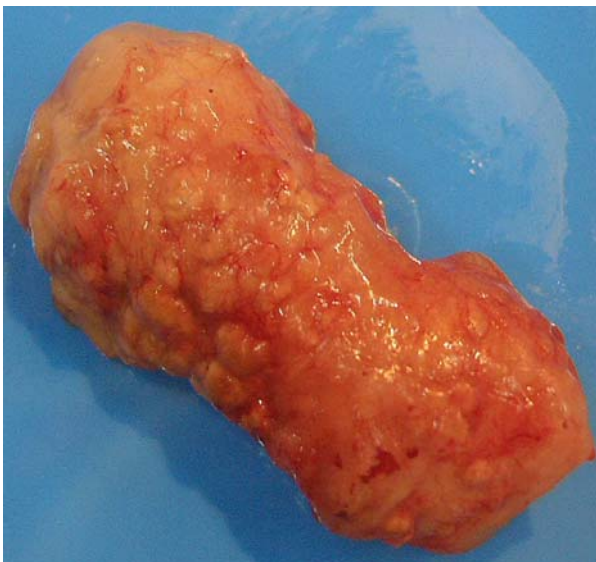


Figura 1. Ipertrofia di tipo nodulare bilaterale a carico delle surrenali confermata istologicamente.

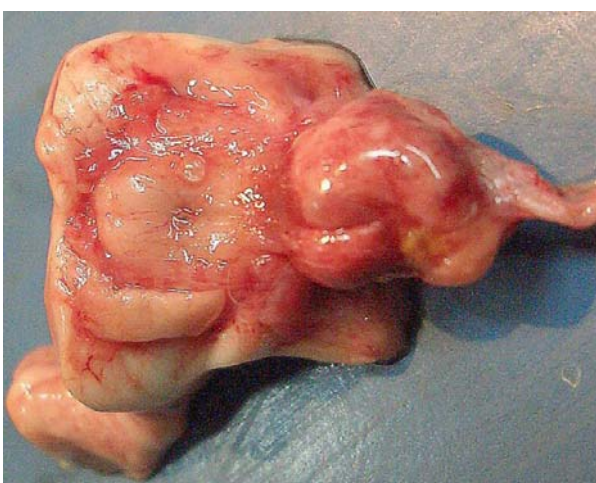


Figura 2. L'ipofisi appariva aumentata di volume e di forma irregolare a livello della sua porzione anteriore.

Esame istopatologico: per quanto riguarda l'esame istopatologico abbiamo preso in considerazione lo stato delle surrenali le quali apparivano alterate strutturalmente ma senza segni riconducibili ad una trasformazione neoplastica, la corticale appariva ipertrofica con particolare sviluppo della zona fasciolata e reticolare. La componente stromale era presente in fasci, tali strutture si portavano dalla superficie all'interno

della ghiandola dandole nel complesso un aspetto nodulare. Nell'ambito dell'ipofisi anteriore si poteva osservare un'area a cellularità omogenea che andava a costituire un nodulo ben delimitato all'interno del parenchima sano, rivelando la tendenza espansiva ma non infiltrativa della neoplasia. Tale limite era distinguibile a maggiore ingrandimento; l'aspetto classico del parenchima ghiandolare riunito in cordoni epiteliali, contrastava rispetto alla porzione competente la neoplasia, dove apparivano cellule nel complesso d'aspetto compatto, di varia grandezza, di forma poliedrica, con nuclei modicamente aumentati di volume e alcune figure mitotico. Nel complesso la neoplasia appariva con la caratteristica architettura del tipo "adenoma diffuso a cellule cromofobe", infatti le cellule erano organizzate a fogli sovrapposti, la vascolarizzazione era presente e lo stroma connettivale, sottile, accompagnava i cordoni cellulari. La caratterizzazione istochimica della neoplasia mediante la colorazione OGF rendeva evidente le cellule cromofobe che apparivano chiaramente in azzurro, mentre ai margini della neoformazione si potevano notare la prevalenza, in giallo, delle cellule acidofile.

Esame immunoistochimico: la rilevazione con la tecnica immunoistochimica permetteva di confermare l'ormonoattività della neoplasia nei confronti dell'ACTH. Il segnale appariva compatto e forte a livello dell'adenoma, mentre nel parenchima circostante non coinvolto, il segnale appariva scarso ed incostante.

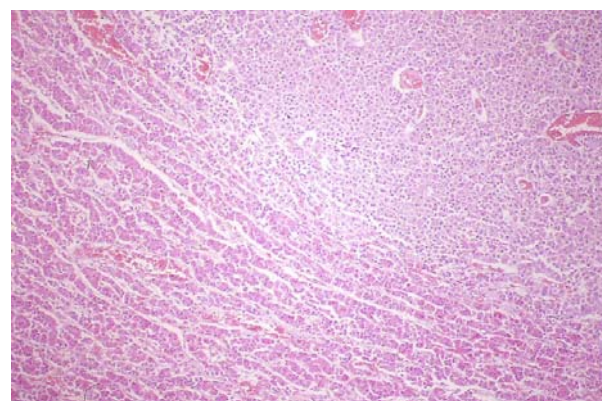


Figura 3. Nell'ambito dell'ipofisi anteriore si poteva osservare un'area a cellularità omogenea che andava a costituire un nodulo ben delimitato all'interno del parenchima normale. E.E. 10X

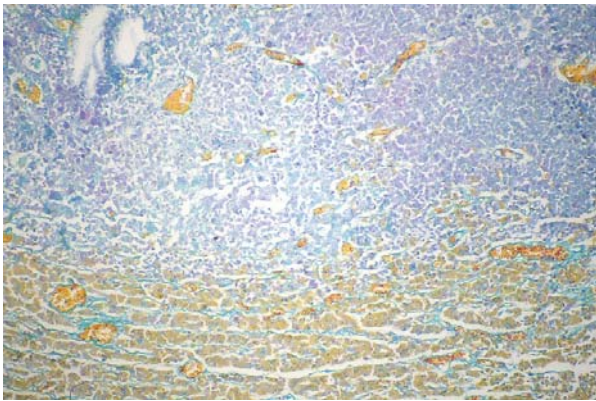


Figura 4. Caratterizzazione istochimica delle cellule cromofobe che appaiono chiaramente rappresentate in azzurro nell'ambito della neoplasia, mentre ai margini della stessa si può notare la prevalenza, in giallo, delle cellule acidofile. OFG 10X

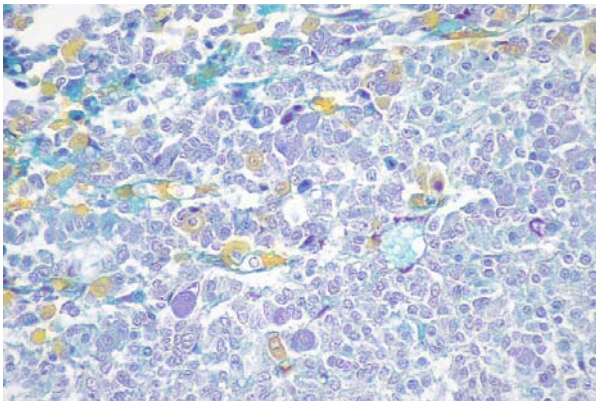


Figura 5. Le cellule cromofobe appaiono di dimensioni variabili con la caratteristica architettura del tipo "diffuso". OFG 40X

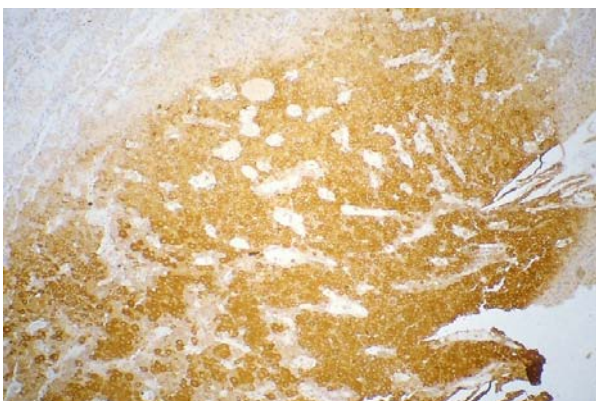


Figura 6. Evidente positività in corrispondenza della neoplasia che conferma l'ormoattività dell'adenoma. IHC 4X

Discussione e conclusioni

Lo studio delle neoplasie a carico della porzione anteriore dell'ipofisi, non prescinde dalla

caratterizzazione istochimica ed immunoistochimica della popolazione cellulare che compone la neoplasia stessa. Questo perché ogni sottopopolazione cellulare ha un suo preciso compito nell'ambito della normale funzione fisiologica della ghiandola, inoltre alcuni ormoni (ACTH in particolare) possono essere prodotti sia dagli elementi cellulari "differenziati" basofili in condizioni fisiologiche, sia in condizioni patologiche, dai precursori di questi ultimi ovvero gli elementi cromofobi. In linea con i dati riportati in bibliografia, questo tipo di adenomi hanno una tendenza espansiva lenta, che però a lungo andare determinano oltre allo squilibrio ormonale imputabile ad un'ipersecrezione di ACTH, un'ipofunzionalità da compressione delle strutture limitrofe alla ghiandola stessa (ipotalamo in particolare). Non vanno escluse inoltre, anche se rare, eventuali forme neoplastiche miste che possono complicare il quadro classificativo del tumore. In questo contesto l'abbinamento della tecnica istochimica OFG ed immunoistochimica per la ricerca dell'ormone ACTH, ha permesso di confermare le ipotesi diagnostiche cliniche e istopatologiche, ovvero di una neoplasia funzionale capace di stimolare in maniera continua la corticale della surrenale determinando una sindrome ipercortisolemica sistemica.

BIBLIOGRAFIA

1. El Etreby MF, Muller-Peddinghaus R, Bhargava AS, Trautwein G. Functional morphology of spontaneous hyperplastic and neoplastic lesions in the canine pituitary gland. *Vet Pathol.* 1980 Mar;17(2):109-22.
2. Trouillas, J., Guigard, M. P., Fonlupt, P., Souchier, C. And Girod, C. Mapping of corticotropic cells in the normal human pituitary 1996 *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 44, 473-479.
3. N. J. Schoemaker, M. H. van der Hage, G. Flik, J. T. Lumeij and A. Rijnberk Morphology of the Pituitary Gland in Ferrets (*Mustela putorius furo*) with Hyperadrenocorticism *J. Comp. Path.* 2004, Vol. 130, 255-265
4. Donald J. Meuten *Tumors in Domestic Animals* IV° Edition
5. Paolo Stefano Marcato *Patologia Sistematica Veterinaria Sistema endocrino* (2002)
6. Davids J. Dabbs *Diagnostic Immunohistochemistry*
7. John D: Bancroft, M. Gamble *Theory and Practice of Histological Techniques* V° Edition