

## ADENOMAS HIPOFISÁRIOS

### RELAÇÃO ENTRE INVASIVIDADE E ÍNDICE PROLIFERATIVO TUMORAL

OSWALDO INÁCIO DE TELLA JR\*, MARCO ANTONIO HERCULANO\*\*, ROSANA DELCELO\*\*\*

**RESUMO** - Analisamos 76 pacientes com adenomas hipofisários do ponto de vista clínico, radiológico e tratamento cirúrgico. Todos os casos foram estudados por imuno-histoquímica e em 49 pacientes foi pesquisado o anticorpo monoclonal PCNA. Os adenomas bi-hormonais foram os mais frequentes seguidos dos prolactinomas e os adenomas não secretantes. Os adenomas bi-hormonais não secretantes e os produtores de subunidade alfa foram proporcionalmente mais invasivos pelos critérios radiológicos. A maioria dos pacientes (59) foi operada por via transeptoefenoidal, em seis casos a via transcraniana foi realizada e em 11 pacientes houve necessidade das duas abordagens. A ressecção foi total em 32 pacientes, a maioria em microadenomas, subtotal em 15 e parcial em 29. A complicação endócrina mais frequente foi diabetes insipidus. Houve tendência de associação positiva para os adenomas secretantes e PCNA mais elevado, assim como relação positiva quando analisamos os adenomas invasivos pela tomografia computadorizada ou ressonância magnética e o PCNA 3 e 4. A melhora visual foi observada em 85% dos macroadenomas, mesmo quando a ressecção foi parcial ou subtotal.

**PALAVRAS-CHAVE:** adenoma hipofisário, invasividade, proliferação tumoral, imuno-histoquímica, PCNA.

#### **Pituitary adenomas: relationship between invasiveness and proliferative cell nuclear index**

**ABSTRACT** - We evaluated clinically, radiologically and surgically a series of 76 pituitary adenomas. All cases were assessed immunohistochemically and in 49 patients the PCNA monoclonal antibody was measured. The most frequent types found were the bihormonal adenomas, followed by prolactinomas and non secreting adenomas. The bihormonal adenomas, non secreting adenomas and the sub unit alfa producing adenomas were proportionally more invase as determined by radiological criteria (CTscan or MRI). In 59 patients a transphenoidal approach was used, six cases were operated on transcranially and in 11 patients we used a combination of both approach. Total resection were achieved in 32 cases, most of which were microadenomas, in 15 cases the resection was subtotal and partial in 29 cases. Diabetes insipidus was the most frequent endocrine complication. It was observed that secreting adenomas tend to be associated with an increased PCNA and invasive adenomas correlated with PCNA 3 and 4. An improvement in vision was observed in 85% of macroadenomas seen after a total, subtotal or partial resection.

**KEY WORDS:** pituitary adenoma, invasiveness, proliferation markers, immunohistochemistry, PCNA.

Os adenomas hipofisários são tumores benignos que representam mais de 10% da clínica neurocirúrgica<sup>1</sup>. A incidência dos diferentes adenomas segundo Laws<sup>1</sup>, é de 14,7 casos para 100.000 habitantes por ano e o achado incidental em necropsia varia de 6 a 22%. No grupo pediátrico, este tipo de tumor representa apenas 2,8% dos adenomas hipofisários, se considerarmos as manifestações clínicas ocorrendo antes dos 17 anos de idade<sup>2</sup>.

\*Professor Livre-Docente da Disciplina de Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM); \*\*Mestre em Neurocirurgia pela Disciplina de Neurocirurgia da UNIFESP – EPM; \*\*\*Professora Assistente da Disciplina de Anatomia Patológica da UNIFESP – EPM. Aceite: 2-agosto-2000.

Dr. Oswaldo Inácio de Tella Jr. - Disciplina de Neurocirurgia, UNIFESP / EPM - Rua Napoleão de Barros 626 - 04024-002 São Paulo SP – Brasil. Fax 11 573-6920. E-mail: detella.ncir@epm.br

A adeno-hipófise contém cinco principais células secretoras, as quais podem ser diferenciadas por métodos imuno-histoquímicos, ou por características morfológicas da microscopia eletrônica. Assim, as lactotróficas secretam prolactina (PRL), as somatotróficas, hormônio do crescimento (GH), as tireotróficas, o hormônio estimulador da tireóide (TSH), as corticotróficas, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e beta lipoproteína e as gonadotróficas secretam o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Acrescente-se ainda que PRL e GH podem ser secretados por células primitivas acidófilas e ACTH, TSH, LH e FSH por células primitivas basófilas<sup>3</sup>.

A incidência relativa dos diferentes adenomas mostra que os funcionantes representam 75% dos casos, sendo o prolactinoma o mais frequente, seguido dos produtores de GH, GH e PRL, ACTH, TSH, LH e FSH. Os não funcionantes (25%), podem ter características oncocíticas ou não oncocíticas (*null cell*) à microscopia óptica e eletrônica<sup>4</sup>.

Os adenomas manifestam-se por alterações visuais ou endócrinas e necessitam de investigações neuroftalmológica e endócrina, com dosagens hormonais basais e com testes de estímulo e supressão<sup>5</sup>.

A avaliação radiológica baseia-se na tomografia computadorizada (TC) com contraste e principalmente com cortes coronais e no exame de ressonância magnética (RM), sem e com gadolínio. Este último permite o diagnóstico de microadenomas maiores de 3 mm. O achado incidental de adenomas pela TC varia de 6 a 12%, mas estudos futuros pela RM podem aumentar esta estatística<sup>6</sup>. Molitch<sup>7</sup>, encontrou de 1,5 a 27% de adenomas incidentais em necropsias de doentes sem suspeita de patologia endócrina.

A classificação proposta por Hardy<sup>8</sup>, em 1969, que gradua e estadia os adenomas na radiografia simples de crânio, pode ser aplicada na TC e RM e desta forma pode-se separar os adenomas em micro (menores que 10 mm) e macro (maiores que 10 mm), invasivos e não invasivos.

O tratamento proposto é geralmente cirúrgico se existirem alterações visuais ou se o tumor for produtor de GH, ACTH ou TSH. Os prolactinomas, na dependência do tamanho e ou resposta a terapia com agonistas dopaminérgicos, podem vir a necessitar de cirurgia. A radioterapia convencional e a radiocirurgia também podem ser utilizadas<sup>9</sup>.

Embora os tumores hipofisários sejam na sua maioria benignos, considerável número deles são invasivos<sup>1</sup> e o estudo de fatores proliferativos poderia fornecer o comportamento biológico destes tumores. Para isso tem se estudado o índice de proliferação celular através do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) por permitir análise de tecido embebido em parafina, e desta forma melhor se avaliar a chance de recidiva e, em alguns casos, indicar-se radioterapia.

## MÉTODOS

Foram estudados 76 pacientes operados no período de 1989 a 1998 no Serviço de Neurocirurgia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), Hospital Professor Edmundo Vasconcelos (SP) e Hospital Samaritano (SP).

Dos pacientes avaliados, 37 (48,7%) eram homens e 39 (51,3%) mulheres. Houve predomínio na quarta e quinta décadas, tendo o mais jovem 13 anos, e o mais idoso 76 anos, conforme o apresentado no Gráfico 1.

### *Quadro clínico*

A cefaléia esteve presente em 40 pacientes (52,6%), seguida da apoplexia em nove casos (11,8%). Lesão do sexto nervo craniano foi observada em apenas um paciente com síndrome de Cushing. Houve presença de fístula líquórica em um paciente previamente tratado com bromocriptina.

As manifestações clínicas, decorrentes de alterações hormonais estão descritas na Tabela 1.

Com relação às alterações visuais, 31 pacientes (41%) apresentaram hemianopsia bitemporal, dois (3%) quadrantoanopsia e oito (7%) outras alterações em que havia amaurose unilateral e perda variável do campo visual no outro olho. Não houve nenhum caso de hemianopsia homônima, 35 pacientes (49%) não apresentaram alterações visuais.

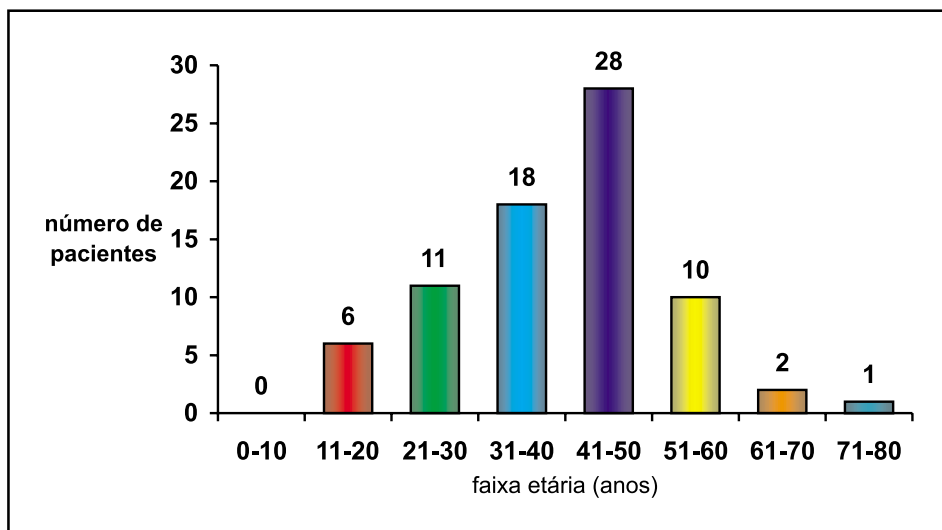


Gráfico 1. Distribuição dos 76 pacientes pela faixa etária.

#### Método diagnóstico

Para se avaliar o grau de invasão e estadios do tumor foram utilizadas as escalas de Hardy & Vezina e Wilson<sup>12</sup>.

Hardy & Vezina graduaram os adenomas de acordo com o achado da planigrafia de sela turca em: 1. Grau I, sela praticamente normal, contendo um microadenoma (tumor menor que 10 mm), podendo apresentar duplo assoalho; 2. Grau II, sela alargada ou assimétrica, sem erosão óssea, com um macroadenoma (maior que 10 mm); 3. Grau III, sela aumentada ou não, mas com assoalho erodido localmente sugerindo invasão de seio esfenoidal; 4. Grau IV, erosão difusa das paredes selares. Os graus I e II estão relacionados com adenomas circunscritos e os III e IV geralmente são invasivos.

Wilson classifica os adenomas de acordo com sua extensão supra e paraselar em: 1. Estadio 0, restrito à sela; 2. Estadio A, ocupa a cisterna supra-selar; 3. Estadio B, oblitera o recesso do terceiro ventrículo; 4. Estadio C, oblitera o terceiro ventrículo e pode atingir o forame de Monro; 5. Estadio D, crescimento paraselar (para o lobo frontal, para o lobo temporal e retro selar); 6. Estadio E, extensão paraselar extradural.

Tabela 1. Incidência de manifestações clínicas, decorrentes dos distúrbios hormonais, apresentadas pelos pacientes incluídos no presente estudo.

Alterações Hormonais	N	%
Sem alterações	30	39,5
Amenorréia e galactorréia	14	18,5
Impotência e perda da libido	12	15,8
Síndrome de Cushing	9	11,8
Acromegalia	9	11,8
Galactorréia	4	5,3
Hipertireoidismo	1	1,3
Perda da libido	1	1,3

#### Anatomia patológica

Para o estudo da coloração com hematoxilina e eosina foi utilizada a técnica descrita por Michalany<sup>10</sup> em que os espécimes enviados foram fixados em formol a 10%, sendo os blocos de parafina cortados na espessura de 5 micras. Foram consideradas células pleomórficas, as que apresentavam núcleos hiper cromáticos, irregulares e com aumento de tamanho. O critério de invasividade foi o aparecimento de grupos tumorais inclusos em tecidos vizinhos, osso ou dura-máter, representados na biópsia.

Pela imuno-histoquímica o método utilizado foi o da avidina-biotina-peroxidase<sup>11</sup>, pesquisando-se os seguintes hormônios: PRL, GH, ACTH, TSH, LH, FSH e subunidade alfa, nos cortes dos blocos de parafina cortados a 4 micras. Como controle positivo foi usada adeno-hipófise de cadáver. Esses exames foram realizados no Departamento de Anatomia Patológica da UNIFESP (Tabelas 3 e 4).

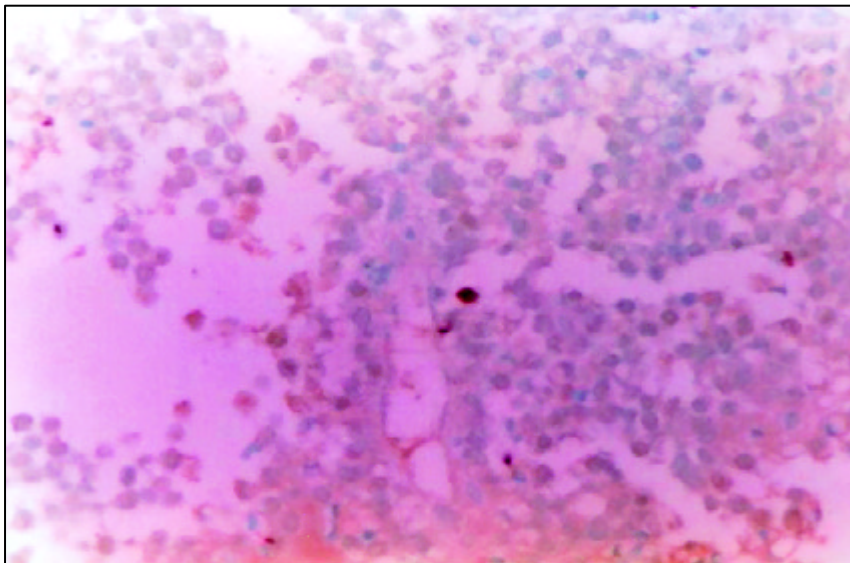


Fig 1. Adenoma hipofisário imunocorado para PCNA, grau 1 (400X).

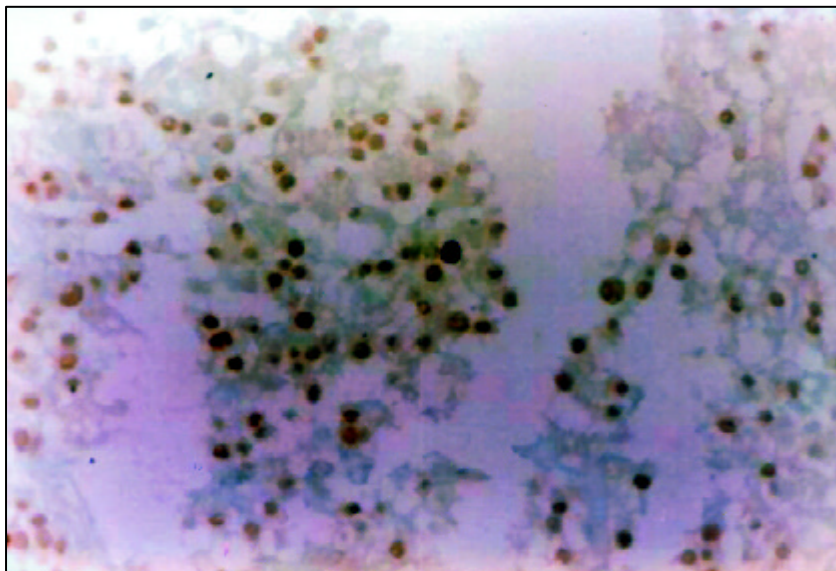


Fig 2. Adenoma hipofisário imunocorado para PCNA, grau 4 (400X).

Para o estudo do PCNA foi usado o anticorpo monoclonal anti-PCNA (clone PC-10, M0879, Dako A/S, Denmark, título 1/9000) e realizado o complexo peroxidase-anti-peroxidase ou avidina-biotina-peroxidase, e os quatro índices utilizados foram obtidos de acordo com a percentagem de células, com coloração positiva dos núcleos contados nos campos padrão examinados. Os núcleos positivos apresentavam coloração castanha, indicando a presença do antígeno, avaliados em microscópio binocular comum com aumento de 400 vezes. Os núcleos com coloração duvidosa foram excluídos da contagem, bem como núcleos de endotélio e de células não tumorais, examinados em dez campos (cem células tumorais). Para controlar a imunorreação foi usada a mucosa gástrica normal, com positividade para as células normais em duplicação, e o controle negativo foi feito substituindo o anticorpo primário por soro normal não imune<sup>12</sup> (Figs 1 e 2).

Para a análise do PCNA foram considerados quatro grupos: 1. coloração em menos que 25% dos núcleos nos campos estudados; 2. entre 25 a 50%; 3. entre 50 a 75% e 4. acima de 75%.

#### *Tratamento cirúrgico*

Os doentes foram operados pelas vias transeptoefenoidal em 59 casos (77,7%), transcraniana em seis casos (7,9%) e por ambas em 11 casos (14,5%). Cinco casos foram reoperados pela mesma via e um reoperado duas vezes. A ressecção cirúrgica foi considerada total em 32 casos (42,1%), subtotal em 15 (19,7%) e parcial em 29 (38,1%).

#### *Análise Estatística*

Para se estudar as relações entre tipos de adenomas hipofisários, invasivos e não invasivos, pela TC e/ou RM, secretantes ou não secretantes e o índice proliferativo (PCNA), foram construídas tabelas de contingência que seriam analisadas pelo Teste do  $\chi^2$ , contudo dadas as restrições de Cochran, as mesmas não puderam ser analisadas, estando assinaladas logo abaixo destas. Foram, então, transformadas em tabelas de associação aplicando-se o teste do  $\chi^2$  e quando presentes as restrições de Cochran usamos o teste exato de Fisher. O nível de rejeição para a hipótese de nulidade foi fixado sempre em um valor menor ou igual do que 0,05 (5%). Quando a estatística calculada apresentar significância usaremos um asterisco para caracterizá-la, caso contrário, isto é, não significante, usaremos N.S.

## RESULTADOS

O adenoma foi considerado invasivo pela TC e/ou RM em 31 pacientes (40,8%).

A TC foi realizada em 66 pacientes (86,9%) e o tumor mostrava-se hiperdenso após a infusão de contraste. Nos casos de microadenomas ela não foi considerada importante para o diagnóstico. Áreas de necrose foram visibilizadas em 21 casos (31,8%).

A RM foi realizada em 48 pacientes (63,1%) com as seguintes características antes e após a infusão de contraste: 1. Imagem isointensa sem contraste e hiperintensa com contraste em 31 casos (64,6%); 2. Imagem isointensa sem contraste e isointensa com contraste em cinco casos (10,5%); 3. Imagem isointensa sem contraste e hipointensa com contraste em oito casos (16,7%); 4. Imagem hiperintensa sem contraste e hiperintensa com contraste em quatro casos (8,4%).

Áreas de necrose ou hemorragias (apoplexia) foram observadas em nove pacientes (18,8%).

O seio esfenoidal foi analisado pela radiografia simples de crânio, TC e RM, sendo considerado como tipo selar em 56 casos (73,7%), tipo pré-selar em 10 casos (13,1%) e ocupado por tumor em 10 casos (13,1%).

O resultado da análise de TC e RM de acordo as escalas de Hardy & Vezina e Wilson estão descritos na Tabela 2.

*Tabela 2. Distribuição dos tumores segundo a classificação da escala de Hardy & Vezina e o estadio segundo Wilson.*

Grau	N	%	Estadio	N	%
1	13	17,1	0	8	10,5
2	32	42,1	A	13	17,1
3	5	6,6	B	25	32,9
4	26	34,2	C	14	18,4
			D	5	6,6
			E	4	5,2
			D e E	4	5,2
			C e E	2	2,6
			C, D e E	1	1,3

*Tabela 3. Distribuição dos tumores segundo a avaliação imuno-histoquímica.*

	N	%
Não secretante	14	15,5
Mono-hormonais	37	56,7
Bi-hormonais	17	18,9
Pluri-hormonais	8	8,9
Total	76	100

*Tabela 5. Distribuição dos tumores segundo o Grau de PCNA, avaliado através do número coloração positiva dos núcleos das células.*

	N	%
Grau 1	17	34,7
Grau 2	5	10,2
Grau 3	15	30,6
Grau 4	12	24,5
Total	49	100

*Tabela 7. Resultado estatístico da invasividade e PCNA 1 & 2.*

	Secretante	Não secretante	Total
Invasivo	5	3	8
Não invasivo	10	5	15
Total	15	8	23

Teste exato de Fischer; p= 0,5961 N.S. ou 59,61% N.S

*Tabela 4. Distribuição dos tumores mono-hormonais, segundo a avaliação imuno-histoquímica.*

	N	%
PRL	14	37,9
ACTH	12	32,4
GH	7	18,9
Subunidade alfa	3	8,1
LH	1	2,7
Total	37	100

*Tabela 6. Resultado estatístico da invasividade e PCNA.*

	PCNA 1 & 2	PCNA 3 & 4	Total
Invasivo	6	14	20
não invasivo	16	13	29
Total	22	27	49

Teste do  $\chi^2$ :  $\chi^2 = 3,03$  N.S.

*Tabela 8. Resultado estatístico da invasividade e PCNA 3 & 4.*

	Secretante	Não secretante	Total
Invasivo	11	3	14
Não invasivo	12	1	13
Total	23	4	27

Teste Exato de Fischer; p= 0,3267 N.S. ou 32,67% N.S

O resultado da imuno-histoquímica e PCNA estão especificados nas Tabelas 3, 4 e 5.

O tratamento estatístico mostrou que houve tendência de associação positiva da relação da imuno-histoquímica com o grau do PCNA para os adenomas secretantes. Os adenomas considerados invasivos pela TC e/ou RM apresentaram tendência de associação positiva para os adenomas com PCNA 3 e 4, como se pode avaliar nas Tabelas 6, 7 e 8.

## DISCUSSÃO

Os adenomas hipofisários representam uma patologia comum na clínica neurocirúrgica e chamam atenção pela controvérsia na indicação do melhor tratamento. Conceitos básicos de neuroendocrinologia e anatomia são importantes para que se possa compreender as manifestações clínicas. Os métodos modernos de diagnóstico por imagem, especificamente o exame de ressonância magnética da região da sela turca, diferenciam partes anatômicas regionais e, em muitos casos,

Tabela 9. Quadro comparativo de nossa série com as séries da literatura.

	Kovacs & Horvath (1986) %	Saeger (1992) %	Tella(2000) %
Adenomas de células GH	14,0	17,0	9,2
Adenomas de células PRL	27,1	30,5	18,4
Adenomas de células ACTH	8,0	14,0	15,7
Adenomas de células TSH	1,0	<1,0	-
Adenomas de células LH/FSH	6,4	2,5	1,3
Adenomas não secretantes	25,3	23,0	18,4
Adenomas pluri-hormonais	3,7	25,0	27,6
Adenomas GH/PRL	8,5	9,5	5,2

permite distinguir a hipófise normal do tecido tumoral, fazendo com que o acesso cirúrgico e o seguimento pós-operatório sejam facilitados. A partir da década de 70, com o advento da imunohistoquímica, ficou bem mais preciso o estudo do material coletado das cirurgias. O índice de proliferação celular do tecido tumoral, pode ser melhor para avaliar a necessidade de tratamento complementar com radioterapia convencional ou radiocirurgia.

Os resultados deste trabalho divergem parcialmente dos de Kovacs & Horvath<sup>13</sup> uma vez que os adenomas produtores de subunidade alfa foram considerados como grupo especial e a percentagem de bi e pluri-hormonais foi elevada. Kovacs et al.<sup>14</sup>, classificam os tumores produtores de mais de um hormônio em monomorfos, dimorfos e plurimorfos conforme a célula tumoral seja de linhagem mono ou pluriclinal, salientando que os adenomas são monoclonais e que nestes casos haveria alguma mutação na célula primitiva de origem. Em relação à casuística de Saeger<sup>15</sup>, que segue a classificação do Clube de Patologia Hipofisária de Paris, também temos diferenças como exposto na Tabela 9.

Em relação ao estudo anatomopatológico dos adenomas pela hematoxilina e eosina os achados foram os mesmos relatados por Delcelo<sup>16</sup>, com predomínio do tipo acidófilo, com arquitetura difusa. O número de figuras de mitose foi reduzido bem como as atipias celulares. Muller et al.<sup>17</sup>, descrevem as colorações citoplasmáticas em que predominam o caráter eosinofílico ou acidófilo na hipófise normal e tal achado verifica-se também nos adenomas. Alberti<sup>12</sup>, cita os adenomas produtores de GH, PRL, GH/PRL e os pluri-hormonais como predominantemente acidófilos, basófilos os de ACTH e cromófobos os adenomas não secretantes e FSH/LH. Tais fatos são confirmados na literatura por Kovacs & Horvath<sup>13</sup>, Scheithauer<sup>18</sup>, e Thapar et al.<sup>19</sup>. Alberti<sup>12</sup>, conclui que as figuras de mitose são raras nos adenomas e pleomorfismo celular está presente em cerca de 32,5% dos casos e estariam relacionados com o padrão papilífero, com a presença de invasão microscópica e estariam mais presentes nos subgrupos GH/PRL e TSH.

O estudo do índice proliferativo pelo PCNA não mostrou os resultados de percentagem de maior positividade, esperados nos macroadenomas com estadios C, D ou E, nos tumores considerados invasivos pela TC e/ou RM e nos adenomas secretantes. Para Hsu et al.<sup>20</sup>, a contagem dos núcleos positivos para o PCNA não está relacionada com idade, sexo ou hipersecreção hormonal, mas é maior nos macroadenomas, nos tumores com extensão extra-selar e quanto maior o seu índice, maior a chance de recorrência do adenoma. Thapar et al.<sup>19</sup>, estudaram o anticorpo monoclonal MIB-1, que detecta os antígenos nucleares relacionados com o Ki-67, em 37 adenomas não invasivos, 33 invasivos e sete carcinomas, estabelecendo que o índice proliferativo superior a 3% está associado com os invasivos, e os carcinomas apresentavam uma média de 11,9%; houve correlação significativa com o MIB-1 maior para os adenomas secretantes em relação aos não secretantes.

Atkins et al.<sup>21</sup>, fizeram estudo comparativo do índice proliferativo dos adenomas hipofisários com Ki-67 e PCNA, em tecidos fixados em formalina e em cultura de células tumorais, encontrando maior especificidade para o Ki-67. Neste estudo, o tecido gástrico normal foi usado como controle para mostrar a especificidade do anticorpo PC-10.

Embora histologicamente benignos, um terço dos adenomas invadem as estruturas adjacentes. Acreditava-se que o estudo do índice proliferativo iria diferenciar os mais agressivos e, portanto, seria indicativo de tratamento complementar com radioterapia. O diagnóstico de invasividade obtido pela TC e/ou RM facilita no planejamento cirúrgico, mas não indica o comportamento biológico do tumor.

Trinta e um pacientes foram considerados como portadores de adenomas invasivos, quando avaliados pela TC ou RM, e procuramos relacionar este fato com as atípicas celulares e com o achado de invasividade nas lâminas coradas pela hematoxilina e eosina; apenas quatro destes pacientes apresentavam pleomorfismo celular e três, sinais de invasão dos tecidos vizinhos. A esta pesquisa foi associado o PCNA, e foram observados oito pacientes no grau 3 e seis no grau 4, dos 20 analisados deste grupo, demonstrando uma pequena associação do índice proliferativo com o caráter invasivo já detectado pelo diagnóstico por imagem. O que merece consideração é o fato de tumores não invasivos apresentarem PCNA elevado e este grupo mereceria um seguimento bastante cuidadoso, para se detectar recorrência ou recidiva precoces.

Houve tendência de associação positiva entre o padrão invasivo radiológico e os índices proliferativos 3 e 4 em nossos pacientes, assim como uma relação entre PCNA 3 e 4 e os adenomas secretantes, quando aplicamos os testes estatísticos específicos.

A abordagem cirúrgica para os adenomas foi a de sempre se considerar primeiro o acesso transeptoefenoidal, com complementação da via transcraniana quando necessária, exceto nos casos em que a sela turca tenha tamanho normal e o tumor cresça superiormente como ocorrido com o paciente mais jovem deste grupo. Como descrito por Landolt & Schiller<sup>22</sup>, pode se dizer que existem quatro tipos de situações em relação à escolha cirúrgica:

1. Indicação restrita da via transeptoefenoidal - microadenomas;
2. Indicação restrita da via transcraniana - sela normal e tumor crescendo para a cisterna supra-selar e adenomas fibrosos;
3. Indicação de escolha do neurocirurgião, em que logicamente prevalece o acesso transeptoefenoidal;
4. Adenomas que não podem ser removidos com uma única cirurgia, sendo necessárias ambas abordagens, no mesmo tempo cirúrgico ou não.

## Conclusões

Pode-se concluir por este estudo que houve uma tendência de associação positiva na relação da imuno-histoquímica com o grau do PCNA para os adenomas secretantes.

Os adenomas considerados invasivos pela TC e/ou RM, apresentaram uma tendência de associação positiva para os adenomas com PCNA 3 e 4.

## REFERÊNCIAS

1. Laws ER. Pituitary tumors: therapeutic considerations: surgical. In Barrow DL, Selman W (eds). Concepts in neurosurgery. Neuroendocrinology, Baltimore: Williams & Wilkins; 1992:395-400.
2. Haddad SF, Vangilder JC, Menezes AH. Pediatric pituitary tumors. Neurosurgery, 1991;29:509-514.
3. Lloyd RV. Cytology and function of the pituitary gland. In Lloyd RV, (ed.) Surgical pathology of the pituitary gland. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993: 5-17.
4. Stefaneanu L, Kovacs K. Light microscopic special stains and immunohistochemistry in the diagnosis of pituitary adenomas. In Lloyd RV, (ed.). Surgical pathology of the pituitary gland. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993:34-51.
5. Couldwell WT, Simard MF, Weiss MH. Management of pituitary adenomas. Neurosurg Quart 1994;4:248-274.
6. Osborn AG, Tong KA. Pituitary adenoma and tumors of Rathke's pouch origin. In Osborn AG, Tong KA (eds). Handbook of neuroradiology: brain and skull. 2.Ed. St. Louis, Mosby, 1996:280-288.



7. Molitch M. Pituitary incidentalomas. *Endocrinol. Metab Clin North Am*, 1997;26:725-740.
8. Hardy J. Transphenoidal microsurgery of the normal and pathological pituitary. *Clin. Neurosurg* 1969;16:185-216.
9. Flickinger JC, Nelson PB, Martinez AAJ, Deutsch M, Taylor F. Radiotherapy of nonfunctional adenomas of the pituitary gland. *Cancer* 1989; 63:2409-2414.
10. Michalany J. Técnicas histológicas em anatomia patológica com instrução para o cirurgião, enfermeiro e citotécnico. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária, 1981.
11. Hsu DW, Raine J, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol*, 1981;75:734-738.
12. Alberti VN. Adenomas hipofisários: determinantes biológicos de agressividade. Tese - Livre-Docência, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1995.
13. Kovacs K, Horvath E. Tumor of the pituitary gland. Atlas of tumor pathology. second series, Washington Armed Forces Institute of Pathology; 1986;21:1-264
14. Kovacs K, Horvath E, Stefaneanu L, et al. Pituitary adenoma producing growth hormone and adrenocorticotropin: a histological, immunocytochemical, electron microscopic and in situ hybridization study. Case report. *J Neurosurg* 1998; 88:1111-1115.
15. Saeger W. Simmonds memorial lecture: pituitary adenoma classification. *Endocr Pathol* 1992; Suppl 1:42-43.
16. Delcelo R. Adenomas hipofisários: aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos. Tese, Mestrado, Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1994.
17. Muller P, Thapar K, Kovacs K. Pituitary adenomas: relationship of tumor size to preservation, pathological type and operative risk. *Endocr Pathol* 1992; 3:33-34.
18. Scheithauer BW. The pituitary and sellar region. In Sternberg SS. (ed.). *Diagnostic surgical pathology*, vol.1. New York: Raven Press, 1994:493-522.
19. Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, et al. Proliferative activity and invasiveness among pituitary adenomas and carcinomas: an analysis using the mib-1 antibody. *Neurosurgery* 1996;38:99-107.
20. Hsu DW, Hakim F, Biller BMK. et al. Significance of proliferating cell nuclear antigen index in predicting pituitary adenoma recurrence. *J Neurosurg* 1993; 78:753-761.
21. Atkin SL, Green VL, Hipkin LJ, et al. Comparison of proliferation indices in human anterior pituitary adenomas using formalin-fixed tissue and in vitro cell culture. *J. Neurosurg* 1997; 87:85-88.
22. Landolt AM & Schiller Z. Surgical technique: transsphenoidal approach. In Landolt AM, Vance ML, Reilly PL. (eds). *Pituitary adenomas*. New York: Churchill Livingstone, 1996:315-331.