

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

**REPLICAÇÃO CELULAR E
ANGIOGÊNESE EM UMA SÉRIE DE
TUMORES DO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL DE ORIGEM
NEUROEPITELIAL E DAS MENINGES
E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO
DE PROLACTINA TECIDUAL E
HIPERPROLACTINEMIA**

Aluno: Denise Maria Dotta Abech
Orientadora: Prof^a. Dra. Miriam da Costa Oliveira
Co-orientadoras: Prof^a. Dra. Lígia Barbosa Coutinho
Prof^a. Dr^a. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira Lima

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Ano 2010

**REPLICAÇÃO CELULAR E ANGIOGÊNESE EM UMA SÉRIE DE
TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE ORIGEM
NEUROEPITELIAL E DAS MENINGES E SUA RELAÇÃO COM A
EXPRESSÃO DE PROLACTINA TECIDUAL E
HIPERPROLACTINEMIA**

DENISE MARIA DOTTA ABECH

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Miriam da Costa Oliveira

Co-orientadoras: Prof.^a Dr.^a. Lígia Barbosa Coutinho

Prof.^a Dr.^a. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira Lima

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA –
como requisito para a obtenção do grau de
Doutor.

PORTO ALEGRE-RS

2010

- A138r Abech, Denise Maria Dotta
- Replicação celular e angiogênese em uma série de tumores do sistema nervoso central de origem neuroepitelial e das meninges e sua relação com a expressão de prolactina tecidual e hiperprolactinemia / Denise Maria Dotta Abech; orient. Miriam da Costa Oliveira; co-orient. Lígia Barbosa Coutinho, Júlia Fernanda Semmelmann Pereira Lima. - Porto Alegre: UFCSPA, 2010.
- 96 fls.; il.; tab.
- Tese (Doutorado) Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Programa de Pós-Graduação em Patologia.
1. Ki 67. 2. Mcm-2. 3. Endoglin. 4. Marcadores de replicação. 5. Marcadores de angiogênese. 6. Prolactina. 7. Tumores do sistema nervoso central. I. Oliveira, Miriam da Costa. II. Coutinho, Lígia Barbosa. III. Pereira Lima, Júlia Fernanda Semmelmann. IV. Título.
- CDD 616.82

AGRADECIMENTOS E DEDICATÓRIAS

À grande amiga e sempre professora Dra. Miriam da Costa Oliveira com quem tive o prazer de iniciar minha vida científica nos idos anos 80, quando ainda era acadêmica, que me acompanha desde então e que contribuiui de forma significativa pelo seu exemplo de trabalho, perseverança, dedicação e espírito científico para meu interesse pela vida acadêmica. Não há palavras para expressar minha gratidão;

À professora Dra. Lúgia Barbosa Coutinho pela co-orientação deste trabalho, pela atenção e auxílio nas revisões de lâminas, sempre disponível em esclarecer minhas dúvidas e principalmente pela segurança de poder contar com seu imenso conhecimento sobre a patologia dos tumores de sistema nervoso central;

Às amigas e colegas de trabalho professora Dra. Júlia Fernanda Pereira Lima e a Dra. Carolina Leães pela atenção, carinho, incentivo e motivação nas horas difíceis e pelas sugestões e ensinamentos, saibam que vocês foram fundamentais para o êxito deste trabalho;

Ao querido e grande neurocirurgião professor Dr. Nelson Pires Ferreira que pelo seu trabalho, dedicação, interesse pelo crescimento científico e confiança em nosso grupo possibilita que muitos de nós cresçamos academicamente;

A todos os estagiários e bolsistas do Centro de Neuroendocrinologia da Santa Casa de Porto Alegre que contribuíram para a execução deste trabalho;

Às funcionárias do gabinete da reitoria, Isa e Daniela, pela incansável atenção, paciência, e auxílio em todos os aspectos, desde pessoal até de encaminhamentos técnicos;

Um agradecimento aos colegas do Laboratório de Patologia do Pós-Graduação da UFCSPA, à Prof^a. Dra. Marilda Cruz Fernandez, e, em especial, a Rosalva e Terezinha, pela contribuição com seu conhecimento técnico, trabalho e dedicação, pela amizade, carinho e acolhida durante todo o período;

Às secretárias do pós-graduação da UFCSPA, inicialmente à Nice pela sua atenção e orientações e posteriormente à Maristela pela atenção, dedicação e disponibilidade em contribuir de forma rápida na obtenção de informações e documentos necessários;

Especialmente agradeço ao meu marido Jorge e ao meu filho Gabriel pelo apoio e compreensão, pela capacidade de resolução de problemas surgidos nos momentos de minha ausência, que neste período todo estiveram sempre prontos a colaborar em todos os aspectos para que eu alcançasse com êxito esta realização pessoal que também é mérito de vocês;

Um agradecimento muito especial a minha mãe Gleusa Oliveira e ao meu padraсто Roberto pela acolhida em sua casa, pelas inúmeras caronas ao aeroporto e à Faculdade nos dias de inverno, que nunca mediram esforços para me ajudar e compartilharam de todos os momentos alegres e das dificuldades surgidas neste período, sempre incansáveis em colaborar e motivar para que tudo sempre desse certo;

A todos os meus irmãos e cunhados pela amizade, carinho, incentivo, interesse e compreensão, em especial às minhas irmãs Maria Alice, Fernanda e Renata, pelas caronas, pelo carinho e conversas de incentivo, que muito contribuíram para me dar ânimo nesta árdua jornada, sintam-se todos responsáveis também por essa vitória.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	3
Prolactina	3
Prolactina e Angiogênese	7
Prolactina e Tumorigênese	9
Prolactina e Tumores Primários do Sistema Nervoso Central	11
Tumores Primários do SNC	12
1. Tumores do Tecido Neuroepitelial	16
1.1 Tumores Astrocíticos	16
1.2 Tumores Oligodendrogliais	20
1.3 Tumores das Meninges - Meningiomas	21
Angiogênese nos tumores do SNC de origem neuroepitelial (astrocitomas e oligodendrogliomas) e nos tumores das meninges (meningiomas)	24
Marcadores de replicação celular Ki-67 e Mcm-2 nos tumores do sistema nervoso central de origem neuroepitelial e nos tumores das meninges	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos	40
3 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	41
4 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
6 ANEXOS	91
ANEXO A. Parecer do CEP da Santa Casa de Porto Alegre	91
ANEXO B. Parecer do CEP da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA	93
ANEXO C. Questionário relativo à exposição	94
ANEXO D. Técnica de imuno-histoquímica	95

LISTA DE ABREVIATURAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CD105	Endogлина
CRH	Hormônio liberador do hormônio corticotrófico
DAB	Diaminobenzidina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GH	Hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador das gonadotrofinas
HGF	Fator de crescimento hepatocitário
HIF-1 α	Fator hipóxia indutível alfa 1
ICC	Coeficiente de correlação intraclasse
Jak2	Janus kinase 2
KDa	Quilodalton
Ki-67	Antígeno de replicação celular
Mcm-2	Proteína mantenedora do minicromossomo 2
Mcm-5	Proteína mantenedora do minicromossomo 5
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PL	Hormônio lactogênio placentário
PRL	Prolactina
PRLIC	Prolactina intracelular
RA	Receptor de andrógeno
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
R-PRL	Receptor de prolactina
SNC	Sistema nervoso central
Stat5	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 5
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TRH	Hormônio estimulante da tireóide
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VIP	Peptídio intestinal vasoativo
β -FGF	Fator de crescimento de fibroblastos beta

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1. Classificação das neoplasias do sistema nervoso	13
Tabela 2. Subtipos histológicos e graduação das neoplasias astrocíticas	17
Tabela 3. Classificação dos meningiomas de acordo com seus subtipos histológicos e grau	23

ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Table 1. Histological classification of tumors	57
Table 2. Distribution of cases according to median age, gender and tumor histology and ICPRL positivity	58
Table 3. Values for cell proliferation (Ki-67 and Mcm-2) and angiogenesis (CD-105) markers in the different histological types according to positive and negative PRLIC variables	59
Table 4. Distribution of cases according to median age, gender and tumor histology and elevated serum PRL.....	60
Table 5. Values for cell proliferation (Ki-67 and Mcm-2) and angiogenesis (CD-105) markers in the different histological types according to elevated and normal serum PRL	61
Table 6. Values for Ki-67, Mcm-2 and CD105 markers according to positive ICPRL and elevated serum PRL (Group 1), positive ICPRL or elevated serum PRL (Group 2) and negative ICPRL and normal serum PRL (Group 3)	62

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS

Tabela 1. Classificação histológica dos tumores	81
Tabela 2. Dados relativos à distribuição dos casos com relação à mediana da idade, sexo e tipo histológico do tumor e a positividade da PRLIC	82
Tabela 3. Valores dos marcadores de proliferação celular (Ki-67 e Mcm-2) e angiogênese (CD-105) nos diferentes tipos histológicos para as variáveis PRLIC positiva e negativa	83
Tabela 4. Dados relativos à distribuição dos casos com relação à idade, sexo e tipo histológico do tumor e a presença de PRL sérica elevada	84
Tabela 5. Valores dos marcadores de proliferação celular (Ki-67 e Mcm-2) e angiogênese (CD-105) nos diferentes tipos histológicos para as variáveis PRL sérica elevada e normal	85
Tabela 6. Valores dos marcadores Ki-67, Mcm-2 e CD105 e sua relação com as variáveis PRLIC positiva e PRL sérica elevada (Grupo 1), PRLIC positiva ou PRL sérica elevada (Grupo 2) e PRLIC negativa e PRL sérica normal (Grupo 3)	86

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Figure 1. (a) Nuclear immunopositivity for the Ki-67 antigen. (b) Positive nuclear expression for Mcm-2. (c) Immunopositivity for the CD-105 marker	63
Figure 2. Cytoplasmatic immunopositivity for intracellular prolactin (PRLIC).	64

ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS

Figura 1. (a) Imunopositividade nuclear para o antígeno Ki-67. (b) Expressão nuclear positiva para o Mcm-2. (c) Imunopositividade para o marcador CD-105.	87
Figura 2. Imunopositividade citoplasmática para a prolactina intracelular (PRLIC)	88

RESUMO DA TESE

No desempenho de inúmeras funções orgânicas em diversos tecidos, a prolactina (PRL) exerce efeitos mitogênico, antiapoptótico, morfogênico, de atividade secretória e modulador da angiogênese. A expressão da PRL e de seu receptor está descrita em tecidos tumorais de mama, próstata e, mais recentemente, em tumores do sistema nervoso central. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da presença da PRL intracelular (PRLIC) e da hiperprolactinemia na replicação celular (estudada pela imunoexpressão dos antígenos Ki-67 e Mcm-2) e angiogênese (estudada através do marcador endoglina - CD-105), em tumores do sistema nervoso central de origem neuroepitelial (41,8% dos casos; sendo 10,2% astrocitomas, 24% glioblastomas e 7,6% oligodendrogliomas) e das meninges (58,2% dos casos). As medianas dos índices Ki-67 e Mcm-2, quantificados como porcentagem de células marcadas, foram significativamente menores nos meningiomas quando comparados aos glioblastomas ($p < 0,001$ para Ki-67 e $p < 0,001$ para Mcm-2) e oligodendrogliomas ($p < 0,001$ para Ki-67 e $p = 0,02$ para Mcm-2). Foi observada boa correlação entre os marcadores de replicação Ki-67 e Mcm-2 ($r_s = 0,60$). Não foi observada diferença significativa na densidade vascular, avaliada como número de vasos por campo, entre os diferentes tipos histológicos. A imuno-histoquímica para a PRLIC foi positiva em 45,6% dos tumores. A PRL sérica variou de 4 a 70 ng/ml e estava elevada em 33,9% dos casos. Quando avaliadas isoladamente, em modelo de regressão linear múltipla, não foi observado efeito importante da PRLIC e PRL sérica sobre os índices Ki-67 e Mcm-2 e a densidade vascular. Quando avaliado o impacto das variáveis PRLIC e PRL sérica combinadas sobre estes marcadores, observou-se uma tendência à elevação do número de vasos no tecido tumoral e aumento significativo dos marcadores de replicação celular ($p = 0,009$ para Ki-67 e $0,05$ para Mcm-2).

A presença da PRL no tecido tumoral e PRL sérica podem constituir fatores moduladores da proliferação celular e angiogênese no sistema nervoso central.

1 INTRODUÇÃO

Historicamente, a prolactina (PRL) é conhecida como o hormônio hipofisário relacionado à lactação, porém, recentemente, têm sido atribuídas a ela mais de 300 ações isoladas, as quais parecem relacionadas, em parte, à distribuição de seu receptor ou às diferentes funções de suas várias isoformas circulantes (Corbacho e cols., 2002). Entre as funções descritas para a PRL, tem sido objeto de estudo sua ação sobre a proliferação celular e a angiogênese (Clevenger e cols., 2009; Jonhanson e cols., 2006).

A atividade proliferativa da prolactina tem sido bem demonstrada *in vitro* em tumores de mama e próstata de ratos e linhagens celulares tumorais de humanos (Goffin e cols., 2005). Hankinson e cols. (1999), investigando a PRL sérica como possível fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama, evidenciaram uma correlação positiva entre os níveis de PRL e o risco de câncer de mama em mulheres na menopausa. Recentes estudos sobre a angiogênese também sugerem que esta proteína possa agir não só como um hormônio circulante, mas também, como fator parácrino e/ou autócrino, principalmente na formação e remodelamento de novos vasos sanguíneos, proliferação e apoptose das células endoteliais (Goffin e cols., 2005).

A associação de hiperprolactinemia e tumores do sistema nervoso central (SNC) foi evidenciada inicialmente por Ciccarelli e cols. (2001) que, em uma série de 42 tumores de SNC, demonstraram que a PRL estava elevada em 27,3% dos meningiomas e 61,5% dos schwannomas e, posteriormente, por Leães e cols. (2007), em uma série de 82 pacientes portadores de tumor primário do sistema nervoso central, sendo detectada hiperprolactinemia em 30,5% dos casos, PRL intracelular em 21,9% e positividade para o receptor da PRL em 39%.

Deste modo, ações da PRL sobre a proliferação celular e angiogênese, associados à identificação de hiperprolactinemia, PRL intracelular e receptores da PRL em tumores cerebrais, bem como o possível estímulo angiogênico e mitogênico determinados pela PRL nas células do SNC merecem ser mais estudados e motivaram esta investigação.

REVISÃO DA LITERATURA

Prolactina

A PRL é um hormônio polipeptídico constituído por 199 aminoácidos, secretado principalmente pelos lactotrofos hipofisários, codificado por um único gene em todos os vertebrados (Owerbach e cols., 1981). O gene humano da PRL, localizado no braço curto do cromossoma 6, é regulado em nível transcripcional por dois promotores distintos: o promotor proximal, também chamado de promotor hipofisário, localizado no exon 1b e o promotor distal, associado à transcrição da PRL nos sítios extra-hipofisários (Goffin e cols., 2005). Muitos hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento afetam o gene da PRL. Entre os fatores de crescimento, a insulina e o fator de crescimento endotelial (EGF) estimulam este gene, enquanto o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) suprime sua ação (Ben-Jonathan e cols., 1996).

A regulação da secreção fisiológica da PRL é complexa. Uma série de substâncias hipotalâmicas e parácrinas hipofisárias participam desta regulação, sendo o controle tônico inibitório determinado pela dopamina hipotalâmica o mais importante entre eles (Norris e cols., 2002). A estimulação da secreção da prolactina envolve vários hormônios e peptídios, entre os quais se destacam o hormônio estimulador da tireóide (TRH), o peptídio intestinal vasoativo (VIP) e o peptídio histidina-isoleucina (Molitch cols., 1995).

A PRL existe sob várias formas moleculares, algumas das quais derivam de um processo pós-translacional da sua forma dominante, a 23KDa (Sinhá e cols., 1995). Em humanos, a PRL circulante parece consistir de cinco isoformas: a molécula clássica de 23 KDa, uma forma glicosilada de 25 KDa, um fragmento de PRL de 16 KDa, dímeros de 50-60

KDa (“big PRL”) e agregados com mais de 100 KDa (“big big PRL”) (Smith e Norman, 1990).

Embora as principais funções orgânicas descritas para a PRL sejam o preparo da mama para o aleitamento e a lactação, recentemente a PRL tem sido objeto de estudos que demonstraram acima de 300 diferentes funções orgânicas para este hormônio em diversos tecidos (Harris e cols., 2004). Nas células, a PRL exerce efeito mitogênico, morfogênico ou atividade secretória (Ben-Jonathan e cols., 1996). Possivelmente, esta ampla diversidade funcional da PRL esteja, em parte, relacionada às diferentes vias de sinalização intracelular e de genes alvo de sua atuação, bem como à sua heterogeneidade molecular como hormônio circulante e tecidual (Sinhá e cols., 1995).

Apesar de a PRL ter sido inicialmente descrita como um hormônio hipofisário exclusivo e a maior parte da PRL circulante ser de origem hipofisária, interesse tem surgido na observação de sua presença e secreção em tecidos não-hipofisários, a PRL extra-hipofisária (Goffin e cols., 2002). Os principais sítios extra-hipofisários descritos de produção da PRL são a decídua, o sistema imunológico, o cérebro e o endométrio (Méndez e cols., 2005)

No que se refere à presença da PRL no SNC, Ben-Jonathan e colaboradores (1996) evidenciaram a presença de neurônios positivos para PRL nos núcleos hipotalâmicos arqueado, supraóptico, paraventricular, dorsomedial e ventromedial, e postularam que a presença de PRL no SNC se deva à produção neuronal de PRL e à passagem de PRL sérica através do plexo coróide. Ainda, esses mesmos autores postulam que, entre suas funções no SNC, destaca-se a regulação da síntese dopaminérgica, ciclo sono-vigília, comportamento sexual, mitogênese de astrócitos, liberação do CRH (hormônio liberador do hormônio corticotrófico), GnRH (hormônio liberador das gonadotrofinas) e composição do líquido, embora pouco se saiba sobre qual sua relevância nesses fenômenos.

Embora a dopamina seja o inibidor fisiológico da PRL hipofisária, o controle da secreção extra-hipofisária da PRL ainda é pouco entendido, não parecendo haver um único inibidor potente para sua secreção extra-hipofisária (Goffin e cols., 2002; Ben-Jonathan e cols., 2008).

As ações da PRL nos diferentes tecidos em diversas espécies animais são mediadas pela ligação com receptores de membrana celular, formando o complexo hormônio-receptor. O receptor humano da PRL (R-PRL) é um membro da superfamília de receptores de citocinas que inclui o receptor do hormônio do crescimento, receptor da leptina, eritropoietina e receptores de várias interleucinas (Harris e cols., 2004). Este receptor é codificado por um único gene, localizado no cromossoma 5, em estrita proximidade ao gene do receptor do hormônio de crescimento (Ben Jonathan e cols., 1996).

O R-PRL é virtualmente expresso em todos os órgãos e tecidos e seu nível pode ser muito baixo em certas células, como as do sistema imunológico. Apesar de o gene do R-PRL ser único em cada espécie, a expressão de várias isoformas varia de acordo com o estágio do ciclo menstrual, da gravidez e da lactação (Goffin e cols., 2002). Com poucas exceções, estas isoformas apresentam idêntico domínio extracelular e transmembrana, apenas diferindo pelo comprimento e/ou composição do seu domínio citoplasmático. Em humanos as sete isoformas do R-PRL identificadas são: isoforma longa, $\Delta S1$, intermediária, PRLBP, TM-ICD, S1a e S1b (Cleveger e cols., 2009). Estas diferenças conferem às diferentes isoformas do R-PRL distintas propriedades biológicas, dependendo de sua habilidade em ativar determinadas sequências de eventos sinalizadores intracelulares (Goffin e cols., 2005). De modo geral, na espécie humana, as isoformas curtas do R-PRL apresentam atividades negativas dominantes, quando comparadas às isoformas longas, pois sua ligação com a PRL é de maior afinidade (Bole-Feysot e cols., 1998).

O hormônio lactogênio placentário e o hormônio do crescimento também se ligam ao R-PRL. O primeiro passo na ativação do receptor é a ligação de um único ligante ao receptor, determinando a dimerização do mesmo, assim, ativando vias de sinalização através das quais a PRL exerce seus efeitos. A ligação da isoforma longa e, presumivelmente, da isoforma $\Delta S1$, resultam da rápida fosforilação do domínio intracelular e a ativação da via Jak2-Stat5 (Clevenger e cols., 2009). A dimerização do R-PRL induz a dimerização da Janus Kinase 2 (Jak2), que fosforila o receptor. O transdutor de sinal e ativador de transcrição (Stat5) se liga aos radicais tirosina do R-PRL fosforilado e é fosforilado pela Jak2. As moléculas Stat5 ativadas dissociam-se do receptor, formam heterodímeros e são translocadas para o núcleo, onde ativam a transcrição gênica promovendo a proliferação celular (Harris e cols., 2004).

A ativação da via Map Kinase parece mediar os efeitos da PRL sobre a proliferação das células mamárias epiteliais (Das e Vonderhaar, 1996). O R-PRL também facilita a ação da família de Src Kinases que, por sua vez, ativam a proteína kinase B e a via da fosfatidilinositol 3-Kinase (PI3 Kinase) (Clevenger e cols., 2003). A ativação destas vias é responsável pela mediação das ações antiapoptóticas e os efeitos de proliferação celular da PRL (Fresno Vara e cols., 2001).

A atenuação da sinalização do R-PRL é mediada por membros da família de genes Socs (genes supressores da sinalização de citocinas), no caso do Socs 1 e Socs 3, isso ocorre através da inibição da via Jak/Stat (Ben-Jonathan e cols., 2008).

Em humanos, os R-PRL já foram descritos em diversos tecidos extra-hipofisários normais como: hipotálamo, plexo coróide e células do sistema imunológico (Ben-Jonathan e cols., 1996). Em tecidos tumorais, os R-PRL foram relatados em tumores de próstata, de mama e em alguns tipos histológicos de tumores do SNC (Clevenger e cols., 2003; Leães e cols., 2007).

Prolactina e Angiogênese

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de avaliar a influência de fatores hormonais sobre a angiogênese (Ferrara e cols., 1991; Fisher e cols., 2005; Jouanneau e cols., 2008).

Um dos maiores avanços da fisiologia na última década foi o de explorar a importância das ações locais, parácrinas ou autócrinas dos hormônios, independentemente de seus efeitos sistêmicos, chegando-se até a postular que a vasculatura fosse um sistema endócrino (Samson e cols., 1997), ou mesmo a existência de um eixo celular endócrino-endotelial envolvido na proliferação celular (Johansson e cols., 2006).

Segundo Corbacho e colaboradores (2002), é reconhecido que membros clássicos da família de peptídeos hormonais que incluem a prolactina (PRL), lactogênio placentário (PL) e GH (hormônio do crescimento), proliferina e proteína relacionada à proliferina, podem ser localmente produzidos pelas células endoteliais ou células vizinhas e podem agir como fatores pró ou antiangiogênicos.

No que se refere especificamente à PRL, acredita-se que sua diversidade funcional esteja relacionada, em parte, à heterogeneidade de sua molécula que, em humanos, se apresenta circulando sob cinco diferentes isoformas (Sinhá e cols., 1995). É bem conhecido que a isoforma de 16 KDa da PRL apresenta habilidade de inibir a angiogênese, principalmente através da inibição da proliferação das células endoteliais estimulada pelo β -FGF e VEGF, da promoção de apoptose das células endoteliais e da inibição da formação capilar (Nguyen e cols., 2006).

Em relação à isoforma de 23 KDa da PRL, vários estudos não foram capazes de demonstrar efeitos da PRL, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sobre a angiogênese (Ferrara e cols.,

1991; Clapp e cols., 1993). Contudo, evidências têm mostrado que a PRL pode estimular o processo angiogênico, porém, que esta ação possa ser dependente do modelo de endotélio utilizado e das condições locais do endotélio (Struman e cols., 1999). Corbacho e colaboradores (2002), avaliando resultados de diferentes modelos experimentais identificaram o papel da PRL sobre a angiogênese e concluíram que provavelmente sua ação ocorra em estágios específicos do desenvolvimento vascular ou em condições de estresse, tais como dano celular, que induzam à expressão do receptor de PRL nas células endoteliais permitindo que a PRL promova a angiogênese ou altere a função das células endoteliais.

Jonhanson e cols. (2006), estudando as células endoteliais das ilhotas pancreáticas, *in vitro* e durante a gravidez de ratas adultas, observaram que as células endoteliais das ilhotas em proliferação podem estimular a proliferação das células beta através da secreção de um fator de crescimento hepatocitário (HGF). A PRL poderia, neste modelo, agir indiretamente, através do estímulo local no aumento de VEGF-A e da insulina, estimulando a liberação do HGF pelas células endoteliais locais, que estimulariam a proliferação das células beta. Isto demonstra a existência de uma interação endotelial-endócrina durante o crescimento das células beta e angiogênese das ilhotas.

Acredita-se assim que o endotélio possa produzir muitos hormônios e expressar receptores hormonais que localmente regulam a sua função, e que, com relação à PRL, o conhecimento da expressão de suas formas variantes por diferentes células endoteliais, associado aos efeitos paradoxais atribuídos a elas nos auxilie a compreender a heterogeneidade das células endoteliais na sua função de regulação da angiogênese (Corbacho e cols., 2002).

Prolactina e Tumorigênese

Tumores resultam da perda do controle dos mecanismos celulares e são afetados por fatores genéticos, ambientais e hormonais. Os hormônios não iniciam a tumorigênese, contudo, podem agir como cofatores promotores do crescimento de células transformadas pela interação com fatores de crescimento e oncogenes (Ben-Jonathan e cols., 2002).

O papel dos esteróides gonadais nos tumores do sistema reprodutivo é bem definido, enquanto o papel da PRL na gênese destes tumores permanece controverso. O fato de a PRL estar envolvida na proliferação e diferenciação do epitélio mamário normal e no preparo para a lactação estimulou a pesquisa sobre a associação entre os níveis séricos da PRL e o risco de câncer de mama (Vonderhaar e cols., 1999).

Dois grandes estudos prospectivos observaram uma associação positiva entre os níveis de PRL e o aumento do risco do câncer de mama em mulheres pós-menopausa (Manjer e cols., 2003; Tworoger e cols., 2004). Um terceiro estudo evidenciou uma associação modesta entre a PRL plasmática e o risco de câncer de mama também em mulheres pré-menopáusicas, indicando que a PRL é um fator importante na etiologia do câncer de mama, particularmente nos tumores com positividade à imuno-histoquímica para o receptor de estrógeno (Tworoger e cols., 2007). Do mesmo modo, anteriormente, níveis séricos de PRL haviam sido utilizados como preditores de sobrevida livre de doença e sobrevida total e indicaram que elevados níveis séricos de PRL no pós-operatório eram fracos preditores de prognóstico para seguimento do câncer de mama (Holtkamp e cols., 1984; Wang e cols., 1995). Em outro estudo (Lissoni e cols., 1995), o achado de hiperprolactinemia, uma semana após a cirurgia, indicou bom prognóstico.

Estes achados motivaram Clevenger e cols. (1995) e Ginsburg e Vonderhaar (1995) a hipotetizar e, subsequentemente, provar que a PRL era sintetizada e secretada nas células e no

tecido mamário humano. Estes autores observaram também que anticorpos neutralizantes anti-PRL inibiam a proliferação celular, corroborando a idéia da existência de uma alça autócrina-parácrina estimulante da proliferação celular. Esta PRL localmente produzida, interagindo com seu receptor de superfície celular, determinaria consequências funcionais subsequentes. Desta forma, acredita-se que as ações proliferativas e promotoras de sobrevivência conferidas à PRL ocorram principalmente através da via autocrina-parácrina (Ben-Jonathan e cols., 2002).

É importante ressaltar que a expressão da PRL e de seu receptor é detectada tanto no tecido mamário normal quanto tumoral, indicando que esta alça autócrina-parácrina é fisiologicamente relevante, não justificando por si a ação pró-tumoral da PRL (Clevenger e cols., 1995; Reynolds e cols., 1997). Recentes estudos têm mostrado que a expressão do R-PRL está aumentada no câncer de mama e que as variações na expressão deste receptor são quantitativas e qualitativas (Goffin e cols., 2005). Meng e cols. (2004) observaram que a razão entre as isoformas curta e longa do R-PRL é menor nos tumores de mama. Como a isoforma curta do receptor representa o domínio negativo das suas atividades, sua baixa expressão nos tumores de mama sugere que as ações proliferativas mediadas pelo R-PRL poderiam estar aumentadas nestes tumores.

Assim como o observado na mama, a expressão da PRL e do R-PRL também é detectada no tecido prostático normal e tumoral. Embora nenhum relato tenha identificado a superexpressão do R-PRL no câncer de próstata, Li e cols. (2004) evidenciaram através da imuno-histoquímica que a expressão da PRL se correlacionou com o grau histológico do tumor: quanto maior o grau do tumor, maior quantidade de PRL detectada. Ahonen e cols. (2003) relataram que a ativação do fator de transcrição Stat-5, determinada pela ligação da PRL com o R-PRL, age como fator de sobrevivência nas células do câncer de próstata e que a sua inibição induz a morte celular no câncer de próstata em humanos.

Mais recentemente, Dagvadorj e cols. (2007) evidenciaram a expressão autócrina da PRL em 54% dos casos de câncer de próstata refratários ao tratamento e em 62% das metástases. O mesmo grupo, utilizando um antagonista específico para o R-PRL ($\Delta 1$ -9G129R-hPRL) demonstrou, pela primeira vez, evidências do potencial envolvimento da PRL autócrina, via controle de alça curta, no crescimento dos cânceres de próstata andrógeno-independentes.

Prolactina e Tumores Primários do Sistema Nervoso Central

A relação entre PRL e tumores do SNC chama a atenção desde 1980, quando os primeiros casos isolados de hiperprolactinemia associada a tumores do SNC foram descritos. Shah e cols., (1980) relataram dois casos de ameno-galactorréia associados à meningioma parasselar, seguidos por Kolodny e cols. (1985), que relataram um caso de hiperprolactinemia associada à lesão expansiva que no estudo histológico mostrou tratar-se de um meningioma.

A associação com hiperprolactinemia já foi relatada em caso de gangliocitoma (McCowen e cols., 1999), cisto epidermóide de terceiro ventrículo (Santosh e cols., 2001) e glioblastoma (Ducret e cols., 2005).

Ciccarelli e cols. (2001), em uma série de 42 tumores de SNC (22 meningiomas, 13 schwannomas, 4 glioblastomas, 2 ependimomas, 1 astrocitoma e 1 caso de neurofibromatose tipo 2), demonstraram que a PRL sérica estava elevada em 27,3% dos meningiomas e detectaram a presença de R-PRL em 45,4% deles. Em relação aos schwannomas, a PRL sérica estava elevada em 61,5% e em 69,2% mostravam-se R-PRL positivos.

Mais recentemente, Leães e cols. (2007), em uma série de 82 pacientes portadores de tumor primário do SNC, encontraram hiperprolactinemia em 30,5% dos casos, PRL intracelular em 21,9% e positividade para o receptor da PRL em 39% dos casos.

Correlacionando estas variáveis com o índice de proliferação celular Ki-67, os autores sugerem a existência de um possível efeito modulador da PRL no desenvolvimento dos tumores primários do SNC.

Tumores Primários do SNC

Os tumores cerebrais são uma causa comum de morte por doença neurológica, sendo a segunda causa após os acidentes vasculares cerebrais. Cerca de 11000 a 13000 americanos morrem dos tumores primários dos SNC a cada ano. Em torno de 50% dos adultos com tumores de SNC sobrevivem 1 ano após o diagnóstico (Doran e Thorell, 2004). A prevalência de tumores no SNC varia de 10 a 17/100.000 para tumores intracranianos e 1 a 2/100.000 para os espinais. Aproximadamente a metade desses tumores é metastática (pulmão, cólon, melanoma, etc) e o restante, primários do sistema nervoso. Esses compreendem 20% das neoplasias na infância, sendo que 70% deles ocorrem na fossa posterior, enquanto que no adulto ocorrem na região supra-tentorial na mesma proporção (Frosch e cols., 2005).

Dentre os tipos tumorais, os gliomas são os mais comuns, perfazendo 50-60% das neoplasias; os meningiomas correspondem a 25%, schwannomas a 10% e os demais, ao restante (Sagar e cols., 1998).

Com a finalidade de unificar a nomenclatura utilizada na definição dos tumores do SNC, a Organização Mundial de Saúde (OMS), baseada em consenso internacional, classifica periodicamente os tumores do SNC. A classificação da OMS para os tumores do sistema nervoso encontra-se na Tabela 1 (Louis e cols., 2007).

Tabela 1. Classificação das neoplasias do sistema nervoso

1. TUMORES DO TECIDO NEUROEPITELIAL	TUMORES DA REGIÃO PINEAL
TUMORES ASTROCÍTICOS	Pineocitoma
Astrocitoma pilocítico	Tumores do parênquima pineal de
Astrocitoma pilomixóide	diferenciação intermediária
Astrocitoma de céls. gigantes subependimário	Pineoblastoma
Xantastrocitoma pleomórfico	Tumor papilar da região pineal
Astrocitoma difuso	TUMORES EMBRIONÁRIOS
Astrocitoma fibrilar	Meduloblastoma
Astrocitoma gemistocítico	M. Desmoplásico/nodular
Astrocitoma protoplasmático	M. com extensa nodularidade
Astrocitoma anaplásico	M. Anaplásico
Glioblastoma	M. de grandes células
Glioblastoma de células gigantes	Tumores Neuroectodérmicos Primitivos
Gliosarcoma	Neuroblastoma do SNC
Gliomatose cerebral	Ganglioneuroblastoma do SNC
	Meduloepitelioma
	Ependimoblastoma
	Tumor rabdóide/teratóide atípico
TUMORES OLIGODENDROGLIAIS	
Oligodendroglioma	
Oligodendroglioma anaplásico	
TUMORES OLIGOASTROCÍTICOS	
Oligoastrocitoma	
Oligoastrocitoma anaplásico	
TUMORES EPENDIMÁRIOS	2. TUMORES DOS NERVOS PERIFÉRICOS
Subependimoma	Schwannoma (neurinoma)
Ependimoma mixopapilar	Celular, plexiforme, melanótico
Ependimoma	Neurofibroma
Celular, papilar, células claras, tanicítico	Plexiforme
Ependimoma anaplásico	Perineuroma
	Perineuroma, NOS
	Perineuroma maligno
TUMORES DO PLEXO CORÓIDE	
Papiloma do plexo coróide	
Papiloma atípico do plexo coróide	Tumor maligno da bainha do nervo
Carcinoma do plexo coróide diferenciação glandular	periférico
OUTROS TUMORES NEUROEPITELIAIS	
Astroblastoma	
Glioma cordóide do terceiro ventrículo	
Glioma angiocêntrico	3. TUMORES DAS MENINGES
TUMORES NEURONAIS	TUMORES DAS CÉLULAS MENINGEAIS
E NEURONAIS-GLIAIS MISTOS	Meningioma
Gangliocitoma displásico do cerebelo	Meningotelial
Astrocitoma infantil desmoplásico	Fibroso (fibroblástico)
Tumor neuroepitelial disembríoplásico	Transicional (misto)
Gangliocitoma	Psamomatoso
Ganglioglioma	Angiomatoso
Ganglioglioma anaplásico	Microcístico
Neurocitoma central	Secretório
Neurocitoma extraventricular	Linfoplasmocitário
Liponeurocitoma cerebelar	Metaplásico
Tumor glioneuronal papilar	Cordóide
Tumor glioneuronal do quarto ventrículo	De células claras
Paraganglioma	Atípico
	Papilar
	Rabdóide
	Anaplásico

TUMORES MESENQUIMAIS	4. LINFOMAS E NEOPLASIAS HEMATOPOIÉTICAS
Lipoma	Linfomas malignos
Angiolipoma	Plasmocitomas
Hibernoma	Sarcoma granulocítico
Liposarcoma	
Tumor fibroso solitário	
Fibrosarcoma	5. TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS
Histiocitoma fibroso maligno	Germinoma
Leiomioma	Carcinoma embrionário
Leiomiosarcoma	Tumor do saco vitelino
Rabdomioma	Coriocarcinoma
Rabdomiosarcoma	Teratoma
Condroma	Maduro, imaturo, com transformação maligna
Condrosarcoma	Tumor misto de células germinativas
Osteoma	
Osteosarcoma	
Osteocondroma	
Hemangioma	6. TUMORES DA REGIÃO SELAR
Hemangioendotelioma epitelióide	Craniofaringeoma
Hemangiopericitoma	Adenomatoso
Hemangiopericitoma anaplásico	Papilar
Angiosarcoma	Tumor de células granulares
Sarcoma de Kaposi	Pituicitoma
Sarcoma de Ewing	Oncocitoma da adenohipófise
LESÕES MELANOCÍTICAS PRIMÁRIAS	
Melanocitose difusa	
Melanocitoma	
Melanoma maligno	
Melanomatose meníngea	
OUTRAS NEOPLASIAS RELACIONADAS AS MENINGES	7. TUMORES METASTÁTICOS
Hemangioblastoma	

Tais tumores também são graduados em diferentes graus que indicam a predição do seu comportamento biológico e influenciam na escolha terapêutica. Desta forma, temos a seguinte classificação:

Grau I – tumores de baixo potencial proliferativo e possibilidade de cura com a ressecção cirúrgica;

Grau II – tumores geralmente infiltrativos, com baixo grau de proliferação, porém que frequentemente recorrem;

Grau III – lesões com evidência histológica de malignidade (mitoses inequívocas) incluindo atipias nucleares e atividade mitótica;

Grau IV – lesões citologicamente malignas. Tumores mitoticamente ativos que infiltram tecidos e disseminam à distância.

A distinção entre os tumores de grau II e os de grau III pode ser alcançada utilizando-se o índice de proliferação celular Ki-67 (clone MIB-1). Outros critérios utilizados, além da avaliação da atividade mitótica, são a proliferação endotelial, necrose em qualquer grau e o aumento da celularidade tumoral.

Os fatores de risco para os tumores primários do SNC incluem história de radiação prévia. Entre os demais fatores, sabe-se que desarranjos moleculares, como mutações gênicas em loci específicos, estão relacionados a alguns tipos de tumores do SNC, embora ainda não se saiba ao certo os fatores indutores e promotores dessa replicação celular errônea. É pouco explorado o papel exercido por fatores hormonais, entre eles a PRL, na gênese e desenvolvimento desses tumores.

A literatura tem evidenciado que os fenótipos malignos dos tumores cerebrais estão relacionados a cinco características ligadas à microvasculatura dos tumores cerebrais que são: proliferação celular, capacidade de invasão, necrose, hemorragia e edema vasogênico (Brem, 2004).

Além do crescimento tumoral, a angiogênese nos tumores de SNC está relacionada aos achados radiológicos, à identificação trans-operatória de vasos tumorais e controle de hemorragias, ao fato de a radioterapia seletivamente atacar o endotélio vascular de resíduos tumorais e, finalmente, aos recentes desenvolvimentos da oncologia, com a possibilidade de terapias angiosupressivas.

1. Tumores do Tecido Neuroepitelial

Como demonstrado na Tabela 1, segundo a classificação da OMS, compõem o grupo dos tumores do tecido neuroepitelial, os tumores astrocíticos, oligodendrogliais, oligoastrocíticos, ependimários, tumores do plexo coróide, tumores neuronais e neurogliais mistos, tumores da região pineal, tumores embrionários e outros tumores neuroepiteliais (Louis e cols., 2007). Os tumores de origem neuroepitelial que se desenvolvem a partir de células gliais são chamados de gliomas. Os gliomas são os tumores cerebrais mais comuns, constituindo de 60% de todos os casos. Este grupo de tumores é composto pelos astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e tumores neuroectodérmicos primitivos (Lantos e cols., 2002).

1.1 Tumores Astrocíticos

São tumores de origem astrocitária e perfazem cerca de 40% dos tumores intracranianos em crianças e adultos, representando 75% dos gliomas em todas as faixas etárias. A OMS classifica os astrocitomas, de acordo com seu potencial de invasão e progressão para as formas mais malignas, em duas categorias maiores: astrocitomas difusos e astrocitomas circunscritos (Ribalta e Fuller, 2004). Os subtipos histológicos das neoplasias astrocíticas e seu grau encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Subtipos histológicos e graduação das neoplasias astrocíticas

Astrocitomas Difusos
Astrocitomas Difusos (OMS grau II)
Astrocitomas anaplásicos (OMS grau III)
Glioblastomas (OMS grau IV)
Astrocitomas Circunscritos
Astrocitoma pilocítico (OMS grau I)
Astrocitoma subependimal de células gigantes (OMS grau I)
Astrocitoma desmoplásico infantil (OMS grau I)
Xantoastrocitoma pleomórfico (OMS grau II)

Os astrocitomas difusos são tumores de baixo grau de malignidade que infiltram as estruturas cerebrais adjacentes, sendo constituídos predominantemente por astrócitos fibrilares. Estes tumores se localizam preferencialmente nos hemisférios cerebrais, especialmente nos lobos frontais e temporais. Macroscopicamente, são tumores esbranquiçados após a fixação, confundindo-se, às vezes, com a substância branca cerebral, da qual diferem pela maior consistência. Histologicamente são constituídos predominantemente por astrócitos estrelados ou triangulares, bem diferenciados, sem arranjo preferencial, com produção de grande quantidade de fibras gliais. A densidade celular é moderada ou baixa e os núcleos celulares arredondados, ovalados, alongados ou irregulares, não mostram atipias acentuadas nem figuras de mitose (Pittella e cols., 2006).

Estudos utilizando o marcador de replicação celular Ki-67, que detecta as células em proliferação durante as fases G1, S e G2/M, têm mostrado correlação entre o índice Ki-67 e o grau histológico destes tumores (Scott e cols., 2005). Radiologicamente, os astocitomas difusos se apresentam à tomografia computadorizada como massa mal definida, homogênea e de baixa densidade, sem captação de contraste. Na ressonância magnética também aparecem como massa mal definida, hipointensa em T1 e hiperintensa e mais delimitada em T2, sem captação de contraste.

Os astrocitomas anaplásicos são tumores que contêm áreas focais ou mais extensas de anaplasia (astrocitoma grau III), podendo se originar de um astrocitoma de baixo grau (grau II). O astrocitoma anaplásico tende a ser mais delimitado em relação ao tecido nervoso adjacente. O tecido tumoral é cinza-escuro e granular e, ao microscópio, mostra densidade celular moderada a elevada, atipias nucleares, células gigantes uni ou multinucleadas e figuras de mitose. A presença de proliferação microvascular ou necrose requer reclassificar um astrocitoma grau III em glioblastoma. De modo geral, os astrocitomas anaplásicos tipicamente apresentam progressão para glioblastoma depois de uma média de 2 anos (Ribalta e Fuller, 2004).

O glioblastoma, também conhecido como glioblastoma multiforme, é o tumor cerebral mais frequente e o glioma mais comum e mais maligno, representando 55% dos gliomas intracranianos em todas as idades. Sua incidência é maior entre os 45 e 70 anos e é mais comum no sexo masculino. São geralmente tumores unilaterais e solitários e localizam-se preferencialmente nos hemisférios cerebrais. Tumores multifocais são observados em 2 a 3% dos casos (Ribalta e Fuller, 2004). Com base em suas características clínicas e genéticas, os glioblastomas podem ser classificados em primários e secundários. Glioblastomas primários são mais freqüentes e acometem indivíduos de faixa etária mais avançada, não mostrando evidências clínicas de lesão pré-existente. Em contraste, os glioblastomas secundários atingem populações mais jovens e estão relacionados à progressão de um astrocitoma grau II ou III (Kleihues e Cavenee, 2000).

Macroscopicamente os glioblastomas são mal delineados, as estruturas nervosas pré-existentes não são mais identificadas e o tecido neoplásico é friável, sem brilho, granuloso, acinzentado ou róseo-acinzentado, com focos hemorrágicos e amarelados de necrose. Edema cerebral é precoce e mais intenso no hemisfério ocupado pelo tumor (Pittella e cols., 2006).

Um dos aspectos microscópicos peculiares do glioblastoma é a sua hiper celularidade, traduzida pela proliferação de células pequenas, arredondadas, pouco diferenciadas. Não são raras células gigantes uni ou multinucleadas. As mitoses, típicas e atípicas, são frequentes, assim como a presença de áreas de necrose (Kleihues e Cavenee, 2000). Os glioblastomas são caracterizados também pela sua exuberante angiogênese, um evento necessário para o crescimento e progressão tumoral. Os mecanismos patológicos que induzem a angiogênese nestes tumores não estão esclarecidos (Fisher e cols., 2005). Semenza (2003) postula que estes mecanismos envolvam a coaptação dos vasos nativos pelo glioma, induzindo à expressão de angiopoietina 2 pelas células endoteliais. Subsequentemente, este mesmo autor, propõe que a apoptose vascular e a involução levariam à necrose e hipóxia tumoral que, por sua vez, induziriam à expressão do fator hipóxia indutível alfa 1 (HIF-1 α) e do fator de crescimento vascular endotelial nas células perinecróticas do glioma.

À neuroimagem, os glioblastomas se apresentam como massas de contorno irregular contendo zona periférica que capta intensamente o contraste, envolvendo área central hipodensa à tomografia e hipointensa à ressonância magnética, não captante de contraste, que corresponde à necrose. A intensa captação de contraste pelo tumor reflete a proliferação microvascular e perda da barreira hematoencefálica nos vasos neoformados (Lantos e cols., 2002).

Entre os astrocitomas circunscritos, o astrocitoma pilocítico trata-se de uma neoplasia benigna, de crescimento lento e expansivo, que acomete mais crianças e adolescentes. Localiza-se preferencialmente no quiasma e nervos ópticos, na região hipotalâmica, terceiro ventrículo e cerebelo. Cerca de 90% dos pacientes sobrevivem cinco anos após o diagnóstico (Pittella e cols., 2006). De forma diferente dos astrocitomas difusos, os astrocitomas pilocíticos tem muito pouca tendência de progressão anaplásica (Ribalta e Fuller, 2004).

Macroscopicamente o tecido tumoral apresenta áreas compactas, mais esbranquiçadas, ao lado de áreas menos densas amareladas e cinzentas. Cistos de dimensões variadas podem ser encontrados. Histologicamente são tumores pertencentes ao grau I da OMS, com mediana do índice Ki-67, descrito em várias séries, variando de 0,9 a 4,8%, e não tendo sido observada associação significativa deste índice com recorrência tumoral (Giannini e cols., 1999). O astrocitoma pilocítico costuma ter áreas compactas mais sólidas, com células fusiformes de prolongamentos celulares longos, ricos em fibras gliais, e áreas mais frouxas, formadas por astrócitos estrelados, muitas vezes dispostos ao redor das cavidades císticas. Proliferação microvascular, especialmente na parede dos cistos é relativamente comum, não implicando em transformação maligna (Pittella e cols., 2006).

1.2 Tumores Oligodendrogliais

Os oligodendrogliomas são tumores bem diferenciados (grau II), difusamente infiltrativos, compostos de células semelhantes às células oligodendrogliais normais. A maioria dos tumores ocorre em adultos entre a quarta e quinta décadas de vida (Ribalta e Fuller, 2004). São mais comuns na região fronto-temporal e representam aproximadamente 5% dos tumores intracranianos e 10 a 17% dos gliomas (Lantos e cols., 2002; Sanson e cols., 2003). Algumas vezes, se apresentam com cistos contendo material de aspecto gelatinoso e, com frequência, apresentam calcificações que são um sinal valioso no diagnóstico neurorradiológico da neoplasia. As células são ovóides ou arredondadas, com membrana celular nítida, citoplasma ocupado por vacúolo, em cujo centro se localiza o núcleo, arredondado e hipercromático, de aspecto uniforme (Pittella e cols., 2006). Os oligodendrogliomas apresentam vascularização típica, caracterizada por vasos finos e ramificados (Netto e cols., 2008).

Os oligodendrogliomas anaplásicos são oligodendrogliomas com densidade celular elevada, marcada atipia nuclear, freqüentes figuras de mitoses, proliferação celular e áreas de necrose (oligodendroglioma grau III). Alguns tumores apresentam vascularização intensa e necrose mimetizando um glioblastoma. A distinção morfológica entre um oligodendroglioma anaplásico e um glioblastoma tem grande importância clínica uma vez que a terapêutica e o prognóstico são diferentes. A presença de proliferação microvascular é particularmente importante e deve ser correlacionada com o achado radiológico de captação de contraste (Pittella e cols., 2006).

1.3 Tumores das Meninges - Meningiomas

Segundo a classificação da OMS os tumores das meninges são divididos de acordo com sua origem em: tumores das células meningoteliais, tumores mesenquimais, lesões melanocíticas primárias e outras neoplasias relacionadas às meninges (Louis e cols., 2007).

O subgrupo de tumores das células meningoteliais (aracnoidais) é representado pelos meningiomas. Os meningiomas são tumores benignos, comuns, correspondendo a 20-30% das neoplasias intracranianas. A incidência dos meningiomas é de 6 casos por 100.000 habitantes, aumenta com a idade e é duas vezes maior no sexo feminino (Christensen e cols., 2003).

Além da prevalência dos meningiomas no sexo feminino, a existência de relatos de aumento na velocidade de crescimento dos mesmos durante a fase lútea do ciclo menstrual e durante a gestação (Bickerstaff e cols., 1958; Roelvinck e cols., 1987), bem como a relação de seu aparecimento com o uso de contracepção hormonal, terapia de reposição hormonal e ao câncer de mama, sugerem possível papel dos hormônios sexuais femininos no desenvolvimento dos meningiomas (Custer e cols., 2002; Lieu e cols., 2003). Estas observações motivaram diversos estudos utilizando marcadores imuno-histoquímicos dos

receptores dos hormônios sexuais nestes tumores. A maioria dos meningiomas expressa receptor de progesterona (RP), com frequências variando de 64 a 100% (Carrol e cols., 1993; Hilbig e Barbosa-Coutinho, 1998; Milenkovic e cols., 2004). Para o receptor de andrógeno (RA) são descritas frequências de 39 a 51% (Chen e Chen, 2001; Korhonen e cols., 2006), enquanto que uma ampla variação na expressão do RE é descrita na literatura, desde fracamente expressos até relatos de até 40%, provavelmente devido a diferenças na sensibilidade dos métodos de detecção (Korhonen e cols., 2006). Com relação ao receptor da prolactina (RPRL), sua presença em diversas séries de meningiomas tem variado de 45,4 a 61,7% (Ciccarelli e cols., 2001; Leães e cols., 2007).

Macroscopicamente, os meningiomas se apresentam como massas nodulares de consistência firme, com superfície externa lisa ou nodular, aderidas na face interna da dura-máter e projetando-se na caixa craniana ou no canal vertebral. O tamanho dos nódulos pode variar amplamente, desde alguns milímetros até vários centímetros de diâmetro (Aguilar e cols., 2006). À superfície de corte o tumor pode ser branco-acinzentado, firme, com estrutura espiralada; outras vezes, é homogêneo e de consistência mole. Com frequência apresentam focos de calcificação. Certos meningiomas são intensamente vascularizados e, por esta razão, avermelhados. Todos estes aspectos podem coexistir no mesmo tumor (Pittella e cols., 2006).

De acordo com a sua probabilidade de recorrência, os meningiomas são classificados em três graus. A grande maioria dos meningiomas tem comportamento biológico benigno e se encontra no grau I. Entretanto, estes tumores podem ter comportamento biológico mais agressivo ou de baixo grau de malignidade (grau II) ou ainda de comportamento maligno (grau III). A classificação dos subtipos histológicos dos meningiomas de acordo com o seu grau encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Classificação dos meningiomas de acordo com seus subtipos histológicos e grau

Grau	I	II	III
	Meningotelial	Atípico	Rabdóide
	Fibroblástico	Meningioma de células claras	Papilar
	Transicional	Meningioma cordóide	Anaplásico
	Psamomatoso		
	Angiomatoso		
	Microcístico		
	Secretor		
	Linfoplasmocítico		
	Metaplásico		

Mais de 80% dos meningiomas benignos são das classes meningeal, transicional ou fibroblástica (Lantos e cols., 2002). Os meningiomas benignos têm bom prognóstico, embora possa haver recorrência do tumor em 7-20% dos casos, mesmo quando ressecados completamente (Pittella e cols., 2006).

Meningiomas atípicos mostram algumas características de malignidade histológica, como a presença de quatro ou mais mitoses por 10 campos de grande aumento, ou o encontro de três dos seguintes aspectos histológicos: alta celularidade, aumento da relação núcleo/citoplasma, nucléolos proeminentes, arranjo arquitetural mais difuso e necrose. Estes tumores representam 4,7-7,2% dos meningiomas, com índices de recidiva de até 50% após cinco anos de tratamento (Frosh e cols., 2005; Pittella e cols., 2006).

Meningiomas anaplásicos ou malignos são tumores que apresentam características histológicas de malignidade, que são a presença de 20 ou mais mitoses por 10 campos de grande aumento e aspectos citológicos semelhantes aos sarcomas, carcinomas ou melanomas. O meningioma anaplásico constitui 1,7-2,8% dos meningiomas (Kleihues e cols., 1993; Kleihues e Cavenee, 2000; Pittella e cols., 2006; Louis e cols., 2007).

Angiogênese nos tumores do SNC de origem neuroepitelial (astrocitomas e oligodendrogliomas) e nos tumores das meninges (meningiomas)

Microvasos intratumorais podem ser identificados utilizando métodos imuno-histoquímicos para coloração de células endoteliais. Entre os anticorpos disponíveis para as células endoteliais humanas, duas categorias podem ser definidas: os marcadores pan-endoteliais e aqueles que se ligam apenas às células endoteliais ativadas ou em proliferação (Vermeulen e cols., 1996). Entre os anticorpos pertencentes à primeira categoria estão o anti-FVIII (antígeno relacionado ao fator VIII ou fator de Von Willebrand), que também pode marcar grandes vasos ou vasos linfáticos, o anti-CD31 (molécula de adesão à célula endotelial plaquetaria), e o anti-CD34, que também pode marcar vasos linfáticos e células estromais. Entre esses antígenos, alguns autores sugerem que o CD31 seja o mais sensível marcador endotelial desta categoria, uma vez que o mesmo reconhece mais vasos e também não reage com linfáticos (Vermeulen e cols., 1996).

Em contraste com os marcadores pan-endoteliais, a endogлина (CD105), uma glicoproteína homodimérica transmembrana de 180 KDa, um componente do complexo receptor do TGF- β , é predominantemente expressa nas células vasculares endoteliais em proliferação e tem mostrado maior especificidade na avaliação da microvasculatura tumoral quando comparada com marcadores pan-endoteliais (Barresi e cols., 2007).

A avaliação da densidade de microvasos foi originalmente descrita por Weidner e cols. (1991), que propuseram a contagem do número de vasos por mm², em três *hot spots*, que são áreas que, na menor magnificação óptica, dão a impressão de conter numerosos microvasos.

Recentemente, Vermeulen e cols. (2002), no segundo consenso internacional sobre a metodologia e critérios para a avaliação e quantificação da angiogênese em tumores humanos sólidos, propoem como métodos padronizados para quantificar a angiogênese o método de

Chalkley, a técnica da fração da proliferação das células endoteliais e a avaliação do índice de pericitos recrutados. E salientam ser a contagem de Chalkley a técnica que apresenta menor variação interobservador, quando comparada à contagem de microvasos.

A técnica de Chalkley, descrita originalmente para avaliar a angiogênese em carcinomas de mama, se caracteriza pela contagem do número de vasos observados na área da lâmina mais vascularizada em que, através do uso de grátula óptica com 25 pontos, são contados os vasos que coincidem com os pontos da grátula (Fox e cols., 1995).

De todos os tumores sólidos, os tumores do SNC apresentam o maior grau de proliferação vascular e, de forma diferente dos tumores sólidos de outras localizações, os tumores de SNC raramente metastizam, sendo seu comportamento maligno e prognóstico determinados pelo seu grau histológico (Fisher e cols., 2005).

A OMS utiliza como critério para a classificação e distinção entre os tumores de SNC de baixo grau e os tumores de alto grau a presença da microproliferação vascular, bem como, este dado serve como parâmetro prognóstico independente nestes tumores (Straume e cols., 2002). Desta forma, a neovascularização se correlaciona, em alguns tumores do SNC, diretamente com a sua agressividade, grau de malignidade, recorrência clínica e sobrevida pós-operatória (Lebelt e cols., 2008).

Segundo Fisher e cols. (2005), em contraste com o dogma de que o desenvolvimento tumoral ocorre em 2 fases, uma fase avascular e outra vascular, estes autores observaram que o crescimento dos tumores cerebrais ocorre em duas fases vasculares. Na primeira fase, os vasos do tecido cerebral normal são coaptados pelo tumor enquanto que, na segunda fase, ocorre a verdadeira neovascularização. Durante a transição entre as duas fases, a expressão do fator hipóxia indutível 1 (HIF-1 α) pelas células em paliçada adjacentes à área necrótica do tumor, estimula a secreção de VEGF e a indução da vascularização. Além disso, alguns oncogenes como o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento derivado de

plaquetas (PDGF) e seus receptores, e mutações em alguns genes supressores tumorais estão envolvidos no processo de crescimento dos gliomas, bem como a perda de heterozigosidade de alguns cromossomas e a frequência e associação destas anormalidades genéticas poderia diferir de acordo com o grau e subtipo tumoral entre os gliomas (Jouanneau e cols., 2008).

Entre os tumores astrocíticos, os glioblastomas são os tumores sólidos mais altamente vascularizados, sendo observada uma proliferação de células endoteliais em gliomas de alto grau 40 vezes maior que aquela observada no tecido cerebral normal (Plake e cols., 1999). Morfologicamente, os glioblastomas, apresentam como característica histológica própria a formação de tufos glomerulóides microvasculares e necrose (Fisher e cols., 2005).

Em estudo avaliando a angiogênese em gliomas, Lebelt e cols. (2008) observaram densidade de microvasos mais elevada nos glioblastomas e correlação significativa entre a vascularização e os graus de malignidade corroborando achados prévios de que a neovascularização nos tumores cerebrais se correlacionam diretamente com o seu comportamento biológico, grau de malignidade e recorrência clínica (Fisher e cols., 2005).

Embora pertençam também ao subtipo neuroepitelial, os oligodendrogliomas são tumores de comportamento mais indolente, com crescimento infiltrativo lento e, em contraste com os astrocitomas, são extremamente quimiossensíveis (Lantos e cols., 2002; Korshunov e cols., 2002). Os oligodendrogliomas mostram vascularização típica, com vasos finos e ramificados e, embora seu modelo vascular seja bem conhecido, pouco se sabe sobre a angiogênese nestes tumores (Netto e cols., 2008). De modo diferente do observado nos astrocitomas, onde o VEGF é considerado um agente central na angiogênese, este marcador não parece ser tão significativo na avaliação da angiogênese em oligodendrogliomas (Christov e cols., 1998; Schiffer e cols., 1999; Vaquero e cols., 2000).

Recentemente, o grupo de Barbosa-Coutinho (Netto e cols., 2008), em estudo avaliando uma série de 30 oligodendrogliomas, comparando a expressão imuno-histoquímica

de VEGF, TGF- β (CD105/endogлина) e CD34, observaram fraca expressão do VEGF nestes tumores, sugerindo que o VEGF tenha pouca influência na angiogênese dos mesmos. Neste mesmo estudo, a quantificação da densidade de microvasos, realizada através da técnica de Chalkley, mostrou ser um método replicável devido à baixa variação inter e intraobservacional.

Os meningiomas são tumores que se caracterizam por serem altamente vascularizados e muito da morbidade intracraniana destes tumores está relacionada ao grau de vascularização e extensão do edema peritumoral (Pistolesi e cols., 2004). Nos meningiomas, a expressão do VEGF mRNA tem se relacionado positivamente com a vascularização, porém, a expressão do VEGF não parece estar relacionada ao tamanho dos meningiomas, subtipo histológico ou grau de malignidade (Nishikawa e cols., 1998).

Embora a densidade de microvasos seja considerada um marcador prognóstico em muitos tumores, dados conflitantes são descritos sobre seu papel prognóstico nos meningiomas, quando quantificada com marcadores pan-endoteliais. Maiuri e cols. (2007) não observaram relação positiva entre os marcadores VEGF e EGF e recorrência dos meningiomas. Porém, utilizando o marcador de angiogenese CD105, Barresi e cols. (2007), em estudo pioneiro utilizando este marcador em uma série de 54 meningiomas, observaram uma relação positiva entre a densidade de microvasos e o prognóstico destes tumores, e sugerem que o CD105 possa ser utilizado como fator prognóstico nos meningiomas.

Marcadores de replicação celular Ki-67 e Mcm-2 nos tumores do sistema nervoso central de origem neuroepitelial e nos tumores das meninges

O anticorpo Ki-67(MIB-1), analisado pela técnica de imuno-histoquímica, tem sido largamente utilizado como marcador de proliferação celular devido a sua aplicabilidade em tecidos fixados em formalina, baixo custo, praticidade e elevada reprodutibilidade (Gerdes e cols., 1984; Burger e cols., 1986; Brow e cols., 1990; Langford e cols., 1996). Apresenta localização complexa e específica no núcleo e é essencial para a proliferação celular (Burger e cols., 1986), estando presente nas células em replicação durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas não na quiescência ou em G0 (Todorov e cols., 1998).

Entre os tumores do SNC, particularmente entre os gliomas, o índice de replicação Ki-67 tem apresentado boa correlação com grau histológico, sendo observado mediana deste índice de 0,4 a 5,5% para os astrocitomas grau II, 2,48 a 13,8% para os astrocitomas anaplásicos e 4,5 a 32,1% para os glioblastomas (Coons, 2004). Raghavan e cols. (2008), em estudo utilizando o índice Ki-67 para avaliar o padrão de proliferação celular em uma série de 80 gliomas, observaram diferenças significativas entre os astrocitomas, astrocitomas anaplásicos e glioblastomas, sugerindo que este índice é útil na diferenciação destes três tipos de tumores.

Entre os oligodendrogliomas, o índice de replicação Ki-67 também apresenta relação com o grau de malignidade tumoral, sendo que índices mais elevados foram observados nos oligodendrogliomas de alto grau (Wharton e cols., 1998). De modo geral, oligodendrogliomas de baixo grau apresentam valores de índice Ki-67 semelhantes ou pouco mais elevados que os astrocitomas difusos, ou seja, 1,2 a 6,0%, enquanto os tumores de alto grau apresentam índice de proliferação entre 5,3 a 11,1% (Coons, 2004). Várias séries indicam que este índice

apresenta além de boa correlação com o grau tumoral, também associação significativa com a taxa de sobrevida (Kros e cols., 1996; Coons e cols., 1997).

Apesar de os meningiomas serem considerados tumores benignos do SNC, seu comportamento biológico é variável e, mesmo entre os meningiomas classificados como grau I, pela OMS, a recorrência pode ocorrer entre 7 a 20% dos casos (Abramovich e Prayson, 1999). A recorrência nos meningiomas está baseada em parâmetros clínicos, radiológicos e histológicos. Outros fatores observados como influentes na recorrência tumoral são: multicentricidade, variantes histológicas, localização, sexo e radioterapia. De modo geral, quanto mais radical a excisão, menores as chances de recorrência (Marks e cols., 1986).

Nos meningiomas, os valores médios observados para o índice Ki-67 são de 3,8%, 7,2% e 14,7%, respectivamente para os meningiomas benignos, atípicos e anaplásicos (Maier e cols., 1997). Além de auxiliar na classificação dos subtipos histopatológicos, nestes tumores, o índice de replicação Ki-67 tem sido utilizado também como preditor de recorrência nos meningiomas. Kim e cols. (2006), estudando indicadores histopatológicos de recorrência em uma série de 206 pacientes portadores de meningioma, observaram que o índice Ki-67 acima de 12% seria um dos fatores preditores independentes na recorrência dos meningiomas. Vankalakunti e cols. 2007, estudando o potencial proliferativo de um grupo de meningiomas grau 1, sugere que o índice Ki-67 tem papel importante na predição de futura recorrência e que pacientes portadores de meningiomas cujo MIB-1 foi superior a 2,6%, mesmo que totalmente ressecados, deveriam ser seguidos meticulosamente. Em estudo recente (Bruna e cols., 2007), foi demonstrado ser o índice Ki-67 o único fator preditor independente de recorrência tumoral e sobrevida geral. Estes achados têm corroborado a importância do índice Ki-67 na classificação e seguimento dos meningiomas.

Além do índice Ki-67, vários outros anticorpos estão disponíveis para a avaliação das proteínas envolvidas no ciclo celular (Bell e Dutta, 2002). Estes incluem marcadores de

células que se encontram em qualquer fase do ciclo celular, como o Mcm-2 (Lei e Tye, 2002), e marcadores pontuais específicos para determinadas fases do ciclo celular (ciclina D1, E,A,B1 e fosfohistona H3), que se elevam em estágios específicos e sofrem rápida degradação à medida que a célula progride para a próxima fase do ciclo (Pines e Hunter, 1992).

A proteína mantenedora do minicromossomo 2 (Mcm-2) é uma das seis proteínas (Mcm-2-7) que se unem no complexo pré-replicativo e são essenciais para a replicação do DNA em células eucarióticas (Lei e Tye, 2002). Alterações nos níveis de uma única proteína do complexo Mcm levam à ruptura da estabilidade genômica e, algumas proteínas implicadas diretamente na patogênese de alguns tipos de carcinomas modulam a atividade deste complexo de proteínas (Forsburg, 2004). Todas as seis proteínas deste complexo são abundantes através do ciclo celular e são quebradas mais rapidamente na diferenciação e mais lentamente na quiescência (Musahl e cols., 1998; Todorov e cols., 1998). Por esta razão, os anticorpos contra estas proteínas têm a capacidade de detectar mais células no ciclo celular do que outros marcadores de proliferação como o antígeno Ki-67 (Todorov e col., 1998). Por apresentarem estas características, a avaliação da expressão das proteínas Mcm, através da imuno-histoquímica, vem se tornando marcador promissor na avaliação da replicação celular em diferentes tumores.

Assim como proposto para a determinação do índice de replicação Ki-67, a quantificação da expressão imuno-histoquímica das proteínas do complexo Mcm é realizada através da identificação das áreas de maior número de núcleos marcados, e os índices são obtidos através da porcentagem de núcleos marcados em 1000 células contadas (Wharton e cols., 2001).

Gakiopoulou e cols. (2007), utilizando anticorpos monoclonais para as proteínas Mcm-2 e Mcm-5 em um grupo de pacientes portadoras de adenocarcinoma de ovário, observaram que a expressão destas proteínas apresentava associação com o grau tumoral,

presença de doença residual e boa correlação com o índice Ki-67. Boyd e cols. (2008), estudando a expressão imuno-histoquímica da proteína Mcm-2 em lesões melanocíticas, observaram que o índice de replicação desta proteína se eleva à medida que a lesão evolui para a malignidade e sugerem que sua expressão possa ser uma ferramenta adicional na distinção de lesões tumorais benignas de malignas. A utilização da expressão da proteína Mcm-2 em carcinoma de mama também evidenciou uma associação positiva com o grau histológico do tumor (Reena e cols., 2008).

No que se refere aos tumores do SNC, poucos estudos na literatura utilizam este marcador de replicação. Wharton e cols. (2001), estudando uma série de oligodendrogliomas, demonstraram que a expressão da proteína Mcm-2 apresentou boa correlação com o índice Ki-67. Neste estudo, a imuno-histoquímica para Mcm-2, consistentemente, identificou uma porcentagem maior de células marcadas, as quais se relacionaram com pior prognóstico.

Scott e cols. (2005), avaliando marcadores de proliferação celular em gliomas de diferentes graus, observaram um aumento significativo na expressão dos marcadores de replicação Ki-67, Mcm-2 e ciclina A e B1, à medida que aumentava o grau do tumor, sugerindo que qualquer um destes elementos tem potencial uso como marcadores do grau tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramovich CM, Prayson RA. Histopathologic features and Ki-67 labeling indices in recurrent and nonrecurrent meningiomas. *Arch Pathol Lab Med*. 1999;123:793-800.
- Aguilar PHP, Ramina R, Veiga JCE, Tella Jr O. Meningiomas: diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico: aspectos atuais. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.
- Ahonen TJ, Xie J, LeBaron MJ, Zhu J, Nurmi M, Alanen K, et al. Inhibition of transcription factor stat5 induces cell death of prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2003;278:27287-92.
- Barresi V, Cerasoli S, Vitarelli E, Tuccari G. Density of microvessels positive for CD105 (endoglin) is related to prognosis in meningiomas. *Acta Neuropathol*. 2007;114:147-56.
- Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:333-74.
- Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*. 2008;29(1):1-41.
- Ben-Jonathan N, Liby K, McFarland M, Zinger M. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends Endocrinol Metabol*. 2002;13(6):245-50.
- Ben-Jonathan N, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev*. 1996;17:639-69.
- Bickerstaff ER, Small JM, Guet IA. The relapsing course of certain meningiomas in relation to pregnancy and menstruation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1958;21:89-91.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in prolactin-receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 1998;19:225-68.
- Boyd AS, Shaktour B, Shyr Y. Minichromosome maintenance protein expression in benign nevi, dysplastic nevi, melanoma, and cutaneous melanoma metastases. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(5):750-4.
- Brem S. Angiogenesis and brain tumors. In: Winn RH ed. *Youmans neurological surgery*. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier. 2004. p. 771-785.
- Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki67: its use in histopathology. *Histopathology*. 1990; 17:489-503.
- Bruna J, Brell M, Ferrer I, Gimenez-Bonafe P, Tortosa A. Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. *Neuropathology*. 2007;27(2):114-20.
- Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer*. 1985;56:1106-11.

Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res.* 1993;53:1312-6.

Chen J, Chen G. Expression of androgen receptors in meningiomas. *J Tongji Med Univ.* 2001;21:140-2.

Christensen HC, Kosteljanetz M, Johansen C. Incidences of gliomas and meningiomas in Denmark. *Neurosurgery.* 2003;52:1327-34.

Christov C, Adle-Biasette H, Le Guerinel C, Natcev S, Gherardi RK. Immunohistochemical detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the vasculature of oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998;24:29-35.

Ciccarelli E, Razzore P, Gaia D, Todaro C, Longo A, Forni M, et al. Hyperprolactinaemia and prolactin binding in benign intracranial tumors. *J Neurosurg.* 2001; 45:70-4.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinol.* 1993;133:1292-299.

Clevenger CV, Chang W-P, Ngo W, Pasha TLM, Montone KT, Tomaszewski JE. Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma: evidence for an autocrine/paracrine loop. *Am J Pathol.* 1995;146:695–705.

Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev.* 2003;24(1): 1-27.

Clevenger CV, Gadd SL, Zheng J. New mechanism for PRLr action in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(5):223-29.

Coons SW, Johnson PC, Pearl DK. The prognostic significance of Ki-67 labeling indices for oligodendrogliomas. *Neurosurgery.* 1997;41:878-84.

Coons SW. Proliferation markers in the evaluation of gliomas. In: Winn RH, editor. *Youmans neurological surgery* 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2004. p. 689-709.

Corbacho AM, Martinez de la Escalera G, Clapp C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol.* 2002;173:219-38.

Custer BS, Koepsell TD, Mueller BA. The association between breast carcinoma and meningioma in women. *Cancer.* 2002;94:1626-35.

Dagvadorj A, Collins S, Jomain J-B, Abdulghani J, Karras J, Zellweger T, et al. Autocrine prolactin promotes prostate cancer cell growth via janus kinase-2-signal transducer and activator of transcription-5a/b signaling pathway. *Endocrinology.* 2007;148(7):3089-101.

Das R, Vonderhaar BK. Involvement of SHC, GRB2, SOS and RAS in prolactin signal transduction in mammary epithelial cells. *Oncogene.* 1996;13:1139-45.

Doran S, Thorell W. Brain tumors: population-based epidemiology, environmental risk factors, and genetic and hereditary syndromes. In: Winn RH, editor. Youmans neurological surgery 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2004. p. 807-815.

Ducret T, Boudina S, Sorin B, Vacher A, Gourdou I, Liguoro D, et al. Effects of prolactin on intracellular calcium concentrations and cell proliferation in human glioma cells. *Glia* 2005;38:200-14.

Ferrara N, Clapp C, Weiner R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*.1991;129:896-900.

Fisher I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol* 2005;15:297-310.

Forsburg SL. Eukariotic MCM proteins: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(1):109-31.

Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantification and prognostic value of breast cancer angiogenesis: Chalkley count and computer image analysis. *J Pathol*. 1995;177:275-83.

Fresno Vara JA, Caceres MA, Silva A, Martin-Perez J. Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Mol Biol Cell*. 2001;12:2171-83.

Frosch MP, Anthony DC, De Girolami U. O sistema nervoso central. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. *Patologia – bases patológicas das doenças 7ª ed*. Riode Janeiro: Elsevier, 2005. p. 1477.

Gakiopoulo H, Korkolopoulo P, Levidou G, Thymara I, Saetta A, Piperi C, et al. Minichromosome maintenance proteins 2 e 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. *Br J Cancer*. 2007;97:1124-34.

Gerdes J, Lemke H, Baish H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J Immunol*. 1984;133:1710-5.

Giannini C, Scheitauer BW, Burger PC, Christensen MR, Wollan PC, Sebo TJ, et al. Cellular proliferation in pilocytic and diffuse astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58:46-53.

Ginsburg E, Vonderhaar BK. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. 1995; *Cancer Res*. 55:2591–5.

Goffin V, Bernichtein S, Touraine P, Kelly P. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endoc Rev*. 2005;26(3):400-22.

Goffin V, Binart N, Toraine P, Kelly PA. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:47-67.

Hankinson SE, Willet WC, Michaud DS, Manson JE, Colditz GA, Longcope C, et al. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Nat Cancer Inst.* 1999;91(7):629-34.

Harris J, Stanford PM, Oakes SR, Ormandy CJ. Prolactin and the prolactin receptor: new targets of an old hormone. *Ann Med.* 2004;36(6):414-25.

Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Meningiomas and hormonal receptors. Immunohistochemical study in typical and non-typical tumors. *Arq Neuropsiquiatr.* 1998;56:193-9.

Holtkamp W, Nagel GA, Wander HE, Rauschecker HF, von Heyden D. Hyperprolactinemia is an indicator of progressive disease and poor prognosis in advanced breast cancer. *Int J Cancer.* 1984;34:323-8.

Johansson M, Mattsson G, Andersson A, Jansson L, Carlsson PO. Islet endothelial cells and pancreatic β -cell proliferation: studies *in vitro* and during pregnancy in adults rats. *Endocrinology.* 2006;147(5):2315-24.

Jouanneau E. Angiogenesis and gliomas: current issues and development of surrogate markers. *Neurosurgery.* 2008;62(1)31-52.

Kim YJ, Ketter R, Henn W, Zang KD, Steudel WI, Feiden W. Histopathologic indicators of recurrence in meningiomas: correlation with clinical and genetic parameters. *Virchows Arch.* 2006;449(5):529-38.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW, editors. Histological typing of tumours of the central nervous system. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1993.

Kleihues P, Cavenee WK, editors. World Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000.

Kolodny J, Diuhy R. Recurrent prolactinoma and meningioma following irradiation and bromocriptine treatment. *Am J Med.* 1985;78:153-5.

Korhonen K, Salminen T, Raitanen J, Auvinen A, Isola J, Haapasalo H. Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen receptor expression. *J Neurooncol.* 2006;80:1-7.

Korshunov A, Golanov A, Sycheva R. Immunohistochemical markers for prognosis of oligodendroglial neoplasms. *J Neurooncol.* 2002;58:237-53.

Kros JM, Hop WC, Godschalk JJ, Krishnadath KK. Prognostic value of proliferation-related antigen Ki-67 in oligodendrogliomas. *Cancer.* 1996;78:1107-13.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins e Cotran, editors. Patologia – Bases patológicas das doenças. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Neoplasia; p. 281-356.

Langford LA, Cooksley CS, DeMonte F. Comparison of KI-67 (KI-67) antigen and bromodeoxyuridine proliferation indices in meningiomas. *Hum Pathol.* 1996;27:350-4.

- Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P. Tumours of the nervous system. In: Graham DI, Lantos PL, editors. *Greenfields neuropathology*. London: Arnold, 2002.
- Leães CGS, Pereira-Filho A, Pereira-Filho JFS, Dallago CM, Batista RL, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP, Oliveira MC. Hyperprolactinemia and immunohistochemical expression of intracellular prolactin and prolactin receptor in primary central nervous system tumors and their relationship with cellular replication. *Brain Tumor Pathol*. 2007;24(2):41-6.
- Lebelt A, Dzieciol J, Guzinska-Ustymowicz K, Lemancewicz D, Zimnoch L, Czykier E. Angiogenesis in gliomas. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(1):69-72.
- Lei M, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci*. 2002;114:1447-54.
- Li H, Ahonen TJ, Alanen K, Xie J, LeBaron MJ, Pretlow TG, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer Res*. 2004;64:4774-82.
- Lieu AS, Hwang SL, Howng SL. Intracranial meningioma and breast cancer. *J Clin Neurosci*. 2003;10(5):553-6.
- Lissoni P, Barni S, Cazzaniga M, Ardizzioia A, Rovelli F, Tancini G, et al. Prediction of recurrence in operable breast cancer by postoperative changes in prolactin secretion. *Oncology*. 1995;52:439-42.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*. 2007;114:97-109.
- Maier H, Wanschitz J, Sedivy R, Rossler K, Ofner D, Budka H. Proliferation and DNA fragmentation in meningioma subtypes. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997;23:496-506.
- Maiuri F, De Caro M del B, Esposito F, Cappabiana P, Strazzullo V, Pettinato G, et al. Recurrences of meningiomas: predictive value of pathological features and hormonal and growth factors. *J Neurooncol*. 2007;82:63-8.
- Manjer J, Johansson R, Berlung G, Janzon L, Kaaks R, Agren A, et al. Post menopausal breast cancer risk in relation to sex steroid hormones, prolactin and SHBG (Sweden). *Cancer Causes Control*. 2003;14:599-607.
- Marks SM, Whitnell HL, Lye RH. Recurrence of meningiomas after operation. *Surg Neurol*. 1986;25:436-440.
- McCowen K, Glickman J, Black P, Zervas N, Lidov H, Garber J. Gangliocytoma masquerading as a prolactinoma. Case report. *J Neurosurg*. 1999;91: 490-5.
- Méndez I, Cariño C, Díaz L. Prolactin in the immunological system: synthesis and biological effects. *Rev Invest Clin*. 2005; 57: 447-56.
- Meng J, Tsai-Moris CH, Dufau ML. Human prolactin receptor variants in breast cancer: low ratio of short forms to the long-form human prolactin receptor associated with mammary carcinoma. *Cancer Res*. 2004;64:5677-682.

Milenkovic S, Breisavac J, Cvetkovic-Dozic D, Skender-Gazibara M, Bojovic V, Berisavac I. Hormone receptors in benign intracranial meningiomas. *J BUON*. 2004;9:295-8.

Molitch ME. Prolactin. In: Melmed S, editor. *The Pituitary*. Boston: Blackwell, 1995. p. 136-186.

Musahl C, Holhoff HP, Lesh R, Knippers R. Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. *Exp Cell Res*. 1998;241:260-4.

Netto CG, Bleil CB, Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Immunohistochemical evaluation of the microvascular density through the expression of TGF-beta (CD 105/endoglin) and CD 34 receptors and expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in oligodendrogliomas. *Neuropathology*. 2008;28:17-23.

Nguyen NQN, Tabruyn SP, Lins L, Lion M, Cornet AM, Lair F, et al. Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potencial role of tilted peptides in angiogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2006;103(39):14319-24.

Nishikawa R, Cheng SY, Nagashima R, Huang HJ, Cavenee WK, Matsutani M. Expressions of vascular endothelial growth factor in human brain tumors. *Acta Neuropathol*. 1998;96:453-62.

Norris AJ, Davis JRE. Prolactinoma. In: Sheppard MC, Stewart PM, editors. *Pituitary disease*. Kluwer, 2002. p. 95-112.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lene WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997;88:277-85.

Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science*. 1981;212:815-16.

Pines J, Hunter T. Cyclins A and B1 in the human cell cycle. *Ciba Found Symp*. 1992;170:187-96.

Pistolesi S, Boldrini L, Gisfredi S, De Ieso K, Camacci T, Caniglia M, et al. Angiogenesis in intracranial meningiomas: immunohistochemical and molecular study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2004;30(2):118-25.

Pittella JEM, Rosemberg S, Hahn MD, Chimelli L, Araujo MBM. Sistema Nervoso. In: Brasileiro Filho G, editor. *Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Plake, KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58:313-20.

Raghavan R, Steart PV, Weller RO. Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme: a Ki-67 study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008;16(2):123-33.

Reena RM, Mastura M, Siti-Aishah MA, Munirah MA, Norlia A, Nagiyah I, et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a reliable proliferative marker in breast carcinoma. *Ann Diagn Pathol*. 2008;12(5):340-3.

- Reynolds C, Montone KT, Powell CM, Tomaszewski JE, Clevenger CV. Distribution of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. *Endocrinol.* 1997;138:5555–60.
- Ribalta T, Fuller G. Brain tumours: An overview on histopathologic classification. In: Winn RH, editor. *Youmans neurological surgery* 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2004. p. 661-672.
- Roelvinck NCA, Kamphorst W, van Alphen HAM, Rao R. Pregnancy-related primary brain and spinal tumors. *Arch Neurol.* 1987;44:209-15.
- Sagar S, Israel M. Tumors of the nervous system. In: Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K, Wilson J, Martin J, Kasper D, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th ed. New York: McGraw-Hill, 1998. p. 2398-2408.
- Samson WK. Cardiovascular hormones. In: Conn PM, Melmed S, Totowa NJ, editors. *Endocrinology: basic and clinical principles*. New York: Humana Press, 1997. p. 361-376.
- Sanson M, Aguirre-Cruz I, Cartalat-Carel S, Hoag-Xuag K. Oligodendrogliomas: an update on basic and clinical research. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2003;3:223-8.
- Santosh I, Rajshekhar V. Galactorrhea as the sole presenting symptom of a posterior third ventricular epidermoid cyst. *Surg Neurol.* 2001; 55:46-9.
- Schiffer D, Bosone I, Dutto A, Di Vito N, Chió A. The prognostic role of vessel productive changes and vessel density in oligodendroglioma. *Neurooncology.* 1999;44:99-107.
- Schmidt N, Westphal M, Hagel C, Ergüin S, Stavrou D, Rosen EM, et al. Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in humans gliomas and their relation to angiogenesis. *Int J Cancer.* 1999;84:10-18.
- Scott IS, Morris LS, Rushbrook SM, Bird K, Vowlert SL, Burnet NG, et al. Immunohistochemical estimation of cell cycle entry and phase distribution in astrocytomas: applications in diagnostic neuropathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005;31:455-66.
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:721-32.
- Shah R, Leavens M, Saman N. Galactorrhea, amenorrhea and hyperprolactinemia as manifestations of parasellar meningioma. *Arch Intern Med.* 1980;140:1608-12.
- Sinha YN. Strutural variants of prolactin: occurance and physiological significance. *Endocr Rev.* 1995;16:354-69.
- Smith CR, Norman MR. Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann Clin Biochem.* 1990;27:542-50.
- Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Goffin JR, et al. Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res.* 2002;62:6808-11.
- Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, et al. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members in

angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(4):1246-51.

Todorov IT, Werness BA, Wang HQ, Buddharaju LN, Todorova PD, Slocum HK, et al. HsMCM2/BM28: a novel protein proliferation marker for human tumors and normal tissues. *Lab Invest*. 1998;78:73-8.

Tworoger SS, Eliassen AH, Rosner B, Sluss P, Hankinson S. Plasma prolactin concentration and risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Res*. 2004;64:6814-19.

Tworoger SS, Eliassen AH, Sluss P, Hankinson S. A prospective study of plasma prolactin concentration and risk of premenopausal and post menopausal breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:1482-88.

Vankalakunti M, Vasishta RK, Radotra BD, Khosla VK. MIB-1 immunolabeling: a valuable marker in prediction of benign recurring meningiomas. *Neuropathology*. 2007;27:407-12.

Vaquero J, Zurita M, Coca S, et al. Prognostic significance of clinical and angiogenesis-related factors in low-grade oligodendrogliomas. *Surg Neurol*. 2000;54:229-34.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 1996;32A(14):2474-84.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002;38:1564-79.

Vonderhaar BK. Prolactin involvement in breast cancer. *Endocr Rel Cancer*. 1999;6:389-404.

Wang DY, Stepniowska KA, Allen DS, Fentiman IS, Bulbrook RD, Kwa HG, et al.. Serum prolactin levels and their relationship to survival in women with operable breast cancer. *J Clin Epidemiol*. 1995;48:959-68.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324:1-8.

Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2001;27:305-13.

Wharton SB, Hamilton FA, Chan WK, Anderson JR. Proliferation and cell death in oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1998;24:21-8.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão das proteínas de replicação Ki-67, Mcm-2 e do marcador de angiogenese CD 105 (endogлина), bem como da expressão da PRL tecidual e hiperprolactinemia em tumores primários do SNC de origem neuroepitelial e das meninges.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a replicação celular de tumores primários do SNC utilizando os marcadores nucleares Ki-67 e Mcm-2;
2. Avaliar a angiogênese de tumores primários do SNC utilizando o marcador CD105;
3. Avaliar a presença de PRL intracelular em células tumorais do SNC;
4. Avaliar, através da dosagem sérica de PRL, a presença de hiperprolactinemia em tumores do SNC;
5. Relacionar os índices Ki-67 e Mcm-2 com as variáveis PRL intracelular e PRL sérica e,
6. Relacionar a angiogênese com as variáveis PRL intracelular e PRL sérica.

3 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Cell replication and angiogenesis in central nervous system tumors and their relationship with the expression of tissue prolactin and hyperprolactinemia

Abech DMD, Pereira-Lima JF, Leães CGS, Meurer RT, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP, Oliveira MC.

UFCSPA - Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

Prolactin (PRL) has mitogenic, antiapoptotic, morphogenic, secretory activity and angiogenesis modulation effects. The expression of PRL and its receptor has been described in breast and prostate tumor tissues, and more recently in central nervous system tumors. This study assessed the effect of intracellular PRL (ICPRL) and hyperprolactinemia on cell replication, using an immunohistochemical (IHC) technique for Ki-67 and Mcm-2, and angiogenesis, using IHC for endoglin CD-105, in central nervous system tumors of neuroepithelial tissue (41.8% of all cases: 10.2% astrocytomas, 24% glioblastomas and 7.6% oligodendrogliomas) and meninges (58.2% of all cases). The medians for Ki-67 and Mcm-2 indexes, calculated as a percentage of marked cells, were significantly lower in meningiomas than in glioblastomas ($p < 0.001$ for Ki-67 and $p < 0.001$ for Mcm2) and oligodendrogliomas ($p < 0.001$ for Ki-67 and $p = 0.02$ for Mcm2). A good correlation was observed between the Ki-67 and Mcm-2 ($r_s = 0.60$) replication markers. There were no significant differences in vascular density between the different histological types. Immunohistochemistry for ICPRL was positive in 45.6% of the tumors. Serum PRL was elevated in 33.9% of the cases. Multiple regression analysis did not reveal any important effect of ICPRL and serum PRL on Ki-67 and Mcm-2 indexes or vascular density. The combined effect of ICPRL and serum PRL on these markers resulted in a greater vascular density in tumor tissue, as well as a significant increase in cell replication markers ($p = 0.009$ for Ki67 and $p = 0.05$ for Mcm-2). PRL in tumor tissue may be a modulation factor of cell proliferation and angiogenesis in the central nervous system.

Key words: Ki-67; Mcm-2; Endoglin; Replication markers; Angiogenesis marker; Prolactin; Central nervous system tumors.

INTRODUCTION

Prolactin (PRL) was originally identified as a neuroendocrine hormone of an exclusively pituitary origin, but its presence and secretion have been recently described in other tissues^(1,2). The main extrapituitary sites of PRL production are the decidua, mammary tissue, T-lymphocytes, brain and endometrium^(3,4). Likewise, PRL receptor (PRL-R) has already been found in the hypothalamus, choroid plexus and lymphocytes⁽³⁾, as well as in prostate and breast tumors and in some cases of central nervous system (CNS) tumors^(5,6,7,8).

More than 300 different organic functions have been reported for PRL in different tissues⁽⁴⁾. At the cellular level, PRL has mitogenic, antiapoptotic, morphogenic, secretory activity and angiogenesis modulation effects^(5,9).

The association between PRL and breast cancer risk has been described by several authors^(10, 11,12), and the expression of PRL and PRL-R has also been detected in prostate cancers⁽¹³⁾, where it has a positive correlation with the histological degree of the tumor⁽¹⁴⁾. Evidence suggests that PRL stimulates cell proliferation, increasing motility and modulating neovascularization in some tumor strains^(5,13).

A recent study demonstrated the presence of PRL and hyperprolactinemia in a series of CNS tumors⁽⁸⁾. Therefore, this study evaluated the possible association between intracellular PRL and elevated serum PRL with cell proliferation, assessed using Ki-67 antigens and the minichromosome maintenance protein 2 (Mcm-2), and with angiogenesis, assessed using endoglin (CD-105).

PATIENTS AND METHODS

This cross-sectional study included 79 cases of primary CNS tumors of neuroepithelial (41.8%) and meningeal (58.2%) origin that were surgically excised

at Hospital São José, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brazil, over a period of 40 months. Patient age ranged from 15 to 86 years (mean age = 55.6 years) and 67% were women. The neuroepithelial tumors were distributed as follows: astrocytomas (10.2%), glioblastomas (24%) and oligodendrogliomas (7.6%). The classification and grading of the tumors according to the World Health Organization (WHO) criteria⁽¹⁵⁾ is shown in Table 1.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). All patients signed an informed consent form, and the authors signed a term of confidentiality.

One day before the procedure, a peripheral blood sample was collected at 8:00 am to measure serum PRL and TSH. The chemoluminescence kit reference values for PRL were 2-17 ng/ml for men and 3-29 ng/ml for women, and for TSH was 0,3-5,0 mUI/mL. Before the surgery, patients were asked about exposure to medications that potentially increase serum PRL levels. An affirmative answer was considered as an exclusion criterion. Others exclusion criterion was presence of tumor located in sellar and parasellar region and elevated TSH levels.

All patients were operated on by the same neurosurgeon (F.N.P.). After routine histopathological exam, a sample of the surgical specimen embedded in paraffin was cut (3 µm microtome) and prepared for immunohistochemistry. The same pathologist examined all slides to confirm the diagnosis and determine tumor histological type and grade according to the WHO criteria⁽¹⁵⁾.

The streptavidin-biotin-peroxidase method was used to detect Ki-67 and Mcm-2 proteins, intracellular PRL and endoglin (CD-105). Primary antibodies used were anti-Ki67 (MIB-1, Dakocytomation, Glostrup, Denmark; dilution 1/150), anti-

Mcm-2 (CRCT2.1, Novocastra, Newcastle, United Kingdom; dilution 1/30), anti-CD105 (4G11, Novocastra, Newcastle, United Kingdom; dilution 1/50) and anti-Prolactin (polyclonal, Dakocytomation, Glostrup, Denmark; ready for use). Antigen recovery for Mcm2 and CD-105 antibodies was conducted using tris-EDTA (pH = 9.0) for 40 minutes, and for Ki-67, sodium citrate (pH = 6.0) for 30 minutes. Antigen recovery was not performed for intracellular PRL. Endogen peroxidase activity was blocked using hydrogen peroxide and non-specific proteins with bovine albumin. The antigen-antibody connection was visualized using diaminobenzidine (DAB). Palatine tonsil was used as positive control for the anti-Ki67, anti-Mcm-2 and anti-CD105, and prolactinoma tissue for anti-Prolactin. The same slices without primary antibody were used as negative controls.

Ki-67 and Mcm-2 indexes were calculated as a percentage of marked nuclei in about 1000 cells and expressed as the mean of the values found by two observers (authors: Abech DMD and Pereira-Lima JF). To evaluate the expression of intracellular PRL (ICPRL), the unequivocal presence of 1% of cells with marked cytoplasm in 300 counted cells was classified as positive⁽⁷⁾. Evaluation of microvascular density (MVD) using anti-CD105mAb was performed using the Chalkley point counting method, internationally acknowledged as the criterion standard for the evaluation of MVD⁽¹⁶⁾. The technique consists of selecting three fields of greater MVD – the so-called hotspots –, which are subjectively chosen on each slide after scanning the tumor section in a microscopic field of low magnification (x100). The Chalkley grid with 25 random points, at a larger magnification (x200), directed to each hotspot so that the greatest number of grid points coincided with the endothelium or fell within the microvascular areas stained

with IHC. Endothelial cells or cell groups were classified as countable microvessels. MVD CD105 was evaluated according to the mean count of microvessels in the three hotspots, also called the Chalkley index or mean MVD. The Chalkley point count was performed by two experienced observers independently. The final MVD was the mean value of the two independent counts.

The median and minimum and maximum values were used in the analysis of quantitative variables because of data asymmetry. The intraclass correlation coefficient (ICC) was used to analyze agreement between the two observers. The Mann-Whitney test was used to compare the Ki-67, Mcm2, CD-105 marker values between groups with positive and negative intracellular prolactin according to the different types of tumors. A linear regression was run on logarithmically transformed data to assess the combined effect of intracellular and serum prolactin on cell proliferation and angiogenesis markers. The level of significance was set at 5%. Data were analyzed using the SPSS 15.0 for Windows.

RESULTS

There was good agreement between readings by the two observers, and the intraclass correlation coefficients (ICC) ranged from 0.96 to 0.99. Figure 1 shows the unequivocal nuclear positivity of Ki-67, Mcm-2 and CD-105 in the tumors under analysis.

Median Ki-67 indexes in meningiomas, astrocytomas, glioblastomas and oligodendrogliomas were 3.0%, 4.7%, 10.4% and 18.6%, and there was a significant difference between meningiomas and glioblastomas ($p < 0.001$) and oligodendrogliomas ($p < 0.001$).

Median Mcm-2 indexes were 7.2%, 6.8%, 30% and 20.4% for meningiomas, astrocytomas, glioblastomas and oligodendrogliomas, and there were significant differences between meningiomas and astrocytomas when compared to glioblastomas ($p<0.001$ and $p<0.001$) and oligodendrogliomas ($p=0.02$ and $p=0.05$).

Median vascular density values were 8.1. 6.7. 9.2 and 12.8 for meningiomas, astrocytomas, glioblastomas and oligodendrogliomas, but there were no significant differences between groups.

The correlation between Ki67 and Mcm-2 was good ($r_s=0.60$), but only fair between vascular density and Mcm-2 ($r_s=0.39$) and Ki-67 ($r_s=0.21$).

Immunohistochemistry for ICPRL was positive in 36 (45.6%) of the tumors. There were no significant differences between groups with and without positivity for ICPRL in age, sex and tumor histological type or cell proliferation and angiogenesis markers (Tables 2 and 3). Figure 2 shows the immunopositivity for ICPRL.

Serum PRL levels, evaluated in 62 patients, ranged from 4 to 70ng/ml, and were high in 19 cases (30.6%). No significant differences were found in age, sex, histological type or cell proliferation and angiogenesis markers between the groups of patients with variable high serum PRL and normal serum PRL (Tables 4 and 5).

When evaluated in isolation using a multiple regression model, no important effect was found for ICPRL or serum PRL on Ki-67 and Mcm-2 indexes and vascular density. Although differences were not statistically significant, the Ki-67 index was elevated in all histological types in the groups with positive ICPRL and high serum PRL.

To assess the possible combined impact of ICPRL and serum PRL variables on cell replication and angiogenesis markers, 62 samples were divided into three

groups: group 1 = positive ICPRL and hyperprolactinemia; group 2 = ICPRL or hyperprolactinemia; and group 3 = negative ICPRL and normal serum PRL. This analysis revealed a trend towards an increase in vascular density in the presence of ICPRL and/or hyperprolactinemia, which was significant for the Ki-67 and Mcm-2 indexes (Table 6).

DISCUSSION

The Ki-67 index, a parameter of cells in the cell cycle, has been extensively studied and validated as a good cell replication marker^(17,18). In some CNS tumors, such as oligodendrogliomas, this index is associated with tumor grade and prognosis^(19,20). The Ki-67 index values in this series were similar to those reported in other studies⁽²¹⁾, although higher in oligodendrogliomas when compared with the series studied by Wharton and cols.⁽¹⁹⁾.

More recently, the minichromosome maintenance protein 2 (Mcm-2) has been used to assess the cell cycle. This is one of 6 maintenance proteins that unite in a pre-replication complex and are essential for the replication of eukaryotic cells⁽²²⁾. Wharton and cols.⁽²³⁾ found a good correlation of this marker with other replication indexes, tumor histological grade and prognosis in oligodendrogliomas.

In gliomas of different grades, Scott and cols.⁽²⁴⁾ found a significant increase in the expression of Ki-67, Mcm-2 and cyclin A and B1 as tumor grade increased, which suggested that any of them might be used as a tumor grade marker. The Mcm-2 index in this study showed a good correlation with the Ki-67 index, with the highest median Mcm-2 in all groups of tumors under study. This finding may be assigned to the fact that Mcm-2 can also identify cells in stage G1 to G0, whereas the Ki-67 marker can only identifies cells in G1⁽²⁵⁾.

The tumor angiogenesis grade measured according to microvascular density has also been used as a potential prognostic marker and possible treatment target in CNS tumors⁽²⁶⁾, particularly for gliomas. However, the results of studies that compared angiogenesis grades with glioma prognoses are conflicting, partly due to the use of pan-endothelial markers that do not react to neovessels or to normal vessels in the tumor⁽²⁷⁾. The superiority of the CD-105 angiogenesis marker over pan-endothelial markers has been described in literature for breast, lung and prostate tumors^(28,29,30) and is explained by the fact that the antibody connects preferably to the activated endothelial cells in angiogenic tissue.

According to the literature, glioblastomas are the most vascularized solid tumors⁽³¹⁾. In a study that evaluated angiogenesis in gliomas, Lebelt and cols.⁽³²⁾ found a greater microvessel density in glioblastomas and a significant correlation with degrees of malignancy. Angiogenesis in oligodendrogliomas, different from in other CNS tumors, is little known. In a recent study, Netto and cols.⁽³³⁾ found a significant difference in microvessel density between grade II and III oligodendrogliomas. Assimakopoulou and cols.⁽³⁴⁾ studied the density of microvessels in brain tumors and found a significantly greater density in high grade (III and IV) astrocytic tumors than in meningiomas, but lower density in oligodendrogliomas. In our series, the comparison of microvessel median densities did not reveal any significant differences between the different types of tumors.

Barresi and cols.⁽³⁵⁾ found a strong correlation between histological grade, Ki-67 index and extension of tumor vascularization using the CD-105 marker in meningiomas. Our study did not confirm their result, as the correlation between replication markers and angiogenesis markers was weak.

Greater control of tumor angiogenesis may have potential therapeutic uses. Therefore, there has been growing interest in the recent recognition of the proliferative and angiogenesis action associated with the activity of PRL, an endocrine and autocrine/paracrine hormone^(9,36). In this sense, the interest in substances with a therapeutic potential against the proliferative action of extrapituitary PRL has grown with the evidence of tissue expression of PRL-R in 80-90% of breast cancers, with greater expression in neoplastic tissue than in the tissue adjacent to the tumor⁽³⁷⁾, and the expression of PRL and activation of stat5a/b in association with tumor grade in prostate cancer⁽¹⁴⁾.

Soares Leães and cols.⁽⁸⁾ studied CNS tumors and found a positive correlation between serum PRL levels and the presence of intracellular PRL, and a possible modulation effect of PRL on cell proliferation, assessed using Ki-67. In this series, the analysis of the combined impact of ICPRL and serum PRL variables revealed a trend towards an increase in microvessel density in tumor tissue and a significant increase in cell replication markers.

To our knowledge, this is the first study to assess the effect of intracellular PRL and the increase in its serum levels on the cell cycle and angiogenesis in CNS tumors. The increase in proliferation and angiogenesis in groups with one of the positive PRL variables (intracellular PRL or hyperprolactinemia), the trend towards an increase in vascular density, and the significant increase in Ki67 and Mcm-2 indexes when both variables were positive suggest that PRL modulation has an effect on cell replication and angiogenesis in tumor tissue. Future clinical studies should investigate possible progression paths in patients with CNS tumors who have hyperprolactinemia or intracellular PRL in tumor cells.

REFERENCES

1. Bachelot A, Binart N. Reproductive role of prolactin. *Reproduction*. 2007;133:361-9.
2. Goffin V, Binart N, Toraine P, Kelly PA. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:47-67.
3. Ben-Jonathan N, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev*. 1996;17:639-69.
4. Harris J, Stanford PM, Oakes SR, Ormandy CJ. Prolactin and the prolactin receptor: new targets of an old hormone. *Ann Med*. 2004;36(6):414-25.
5. Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev*. 2003;24(1): 1-27.
6. Leav I, Merk FB, Lee KF, Loda M, Mandoki M, McNeal JE, et al. Prolactin receptor expression in the developing human prostate and in hyperplasic, dysplasic, and neoplastic lesions. *Am J Pathol*. 1999; 154:863-70.
7. Ciccarelli E, Razzore P, Gaia D, Todaro C, Longo A, Forni M, et al. Hyperprolactinaemia and prolactin binding in benign intracranial tumors. *J Neurosurg*. 2001; 45:70-4.
8. Leães CGS, Pereira-Filho A, Pereira-Lima JFS, Dallago CM, Batista RL, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP, Oliveira MC. Hyperprolactinemia and immunohistochemical expression of intracellular prolactin and prolactin receptor in primary central nervous system tumors and their relationship with cellular replication. *Brain Tumor Pathol*. 2007;24(2):41-6.
9. Ben-Jonathan N, Liby K, McFarland M, Zinger M. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(6):245-50.
10. Vonderhaar BK. Prolactin in human breast cancer development. In: Ethier SP, editor. *Endocrine oncology*. Totowa, NJ: Humana Press;2000. p. 101–20.

11. Tworoger SS, Eliassen AH, Sluss P, Hankinson SE. A prospective study of plasma prolactin concentrations and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:1482-8.
12. Hankinson SE, Willet WC, Michaud DS, Manson JE, Colditz GA, Longcope C, et al. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Nat Cancer Inst.* 1999;91(7):629-34.
13. Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen PM, Harkonen PL. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest.* 1997; 99:618-27.
14. Li H, Ahonen TJ, Alanen K, Xie J, LeBaron MJ, Pretlow TG, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer Res.* 2004;64:4774-82.
15. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.
16. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002;38:1564-79.
17. Mckeever PE, Ross DA, Strawderman MS, Brunberg JA, Greenberg HS, Junck L. A comparison of the predictive power for survival in gliomas provided by MIB-1, bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen with histopathologic and clinical parameters. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56:798-805.
18. Onda K, Davis RL, Shibuya M, Wilson CB, Hoshino T. Correlation between the bromodeoxyuridine labeling index and MIB-1 and Ki-67 proliferating cell indices in cerebral gliomas. *Cancer.* 1994;74:1921-6.

19. Wharton SB, Hamilton FA, Chan WK, Anderson JR. Proliferation and cell death in oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998;24:21-8.
20. Reifenberger G, Kros JM, Burger PC, Louis DN, Colins VP. Oligodendroglioma. In: Kleihues P, Cavenee WK, editors. *Pathology and genetics. Tumours of the nervous system.* Lyon: IARC Press, 2000. p. 56-61.
21. Haddad G, Al-Mefty O, Abdulrauf S. Meningiomas. In: Winn RH, editor. *Youmans neurological surgery 5 th ed.* Philadelphia, PA: Elsevier, 2004. p. 1099-1128.
22. Lei M, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci.* 2002;114:1447-54.
23. Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Willians GH. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001;27:305-13.
24. Scott IS, Morris LS, Rushbrook SM, Bird K, Vowlert SL, Burnet NG, et al. Immunohistochemical estimation of cell cycle entry and phase distribution in astrocytomas: applications in diagnostic neuropathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005;31:455-66.
25. Todorov IT, Werness BA, Wang HQ, Buddharaju LN, Todorova PD, Slocum HK, et al. HsMCM2/BM28: a novel protein proliferation marker for human tumors and normal tissues. *Lab Invest.* 1998;78:73-8.
26. Jouanneau E. Angiogenesis and gliomas: current issues and development of surrogate markers. *Neurosurgery.* 2008;62(1)31-52.
27. Kumar P, Wang JM, Bernabeau C. CD 105 and angiogenesis. *J Pathology.* 1996; 178:363-6.

28. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD 105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 1999;59:856-61.
29. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res.* 2001;7:3410-5.
30. Wikström P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate.* 2002;51:268-75.
31. Plake, KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58:313-20.
32. Lebelt A, Dzieciol J, Guzinska-Ustymowicz K, Lemancewicz D, Zimnoch L, Czykier E. Angiogenesis in gliomas. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(1):69-72.
33. Netto CG, Bleil CB, Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Immunohistochemical evaluation of the microvascular density through the expression of TGF-beta (CD 105/endoglin) and CD 34 receptors and expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in oligodendrogliomas. *Neuropathology.* 2008;28:17-23.
34. Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Papadakis N, Varakis I. Microvessel density in brain tumors. *Anticancer Res.* 1997;17:4747-53.
35. Barresi V, Cerasoli S, Vitarelli E, Tuccari G. Density of microvessels positive for CD105 (endoglin) is related to prognosis in meningiomas. *Acta Neuropathol.* 2007;114:147-56.
36. Tallet E, Rouet V, Jomain JB, Kelly PA, Bernichtein S, Goffin V, et al. Rational design of competitive prolactin/growth hormone receptor antagonist. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2008;13:105-17.

37. Llovera M, Pichard P, Bernichtein S, Jeay S, Touraine P, Kelly PA, et al. Human prolactin antagonists inhibit hPRL-activating signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*. 2000;19:4695-4705.

Table 1 – Histological classification of tumors

Histological type	n	Grade
Meningiomas		
Meningothelial	11	I
Fibroblastic	9	I
Transitional	9	I
Psammomatous	5	I
Angiomatous	6	I
Microcystic	1	I
Secretor	1	I
Atypical	4	II
Astrocytoma		
Pilocytic	2	I
Diffused	2	II
Anaplastic	4	III
Oligodendroglioma	2	II
Anaplastic oligodendroglioma	4	III
Glioblastoma	19	IV

Table 2 – Distribution of cases according to median age, sex, tumor histological type and ICPRL positivity

	ICPRL positive	ICPRL negative	
Variable	n=36	n=43	p*
Age	57 (15 to 84)	60 (26 to 86)	0.54
Women	20 (56%)	33 (77%)	0.08
Histological type			0.68
Meningioma	19 (53%)	27 (63%)	
Astrocytoma	4 (11%)	4 (9%)	
Glioblastoma	9 (25%)	10 (23%)	
Oligodendroglioma	4 (11%)	2 (5%)	

Data presented as a median (minimum and maximum)

* p = Qui-square

ICPRL = intracellular prolactin

Table 3 – Values for cell proliferation (Ki-67 and Mcm-2) and angiogenesis (CD-105) markers in different histological types according to positive and negative ICPRL variables

Histological type	n	Positive ICPRL	n	Negative ICPRL	p**
		Ki-67 (%)		Ki-67 (%)	
Meningiomas	19	3.5 (0.8 to 12.9)	27	3.0 (0.9 to 9.8)	0.47
Astrocytomas	4	12.1 (2.6 to 35.0)	4	4.1 (2.6 to 12.2)	0.49
Glioblastomas	9	10.5 (6.0 to 20.3)	10	9.8 (2.3 to 34.0)	0.76
Oligodendrogliomas	4	18.5 (11.4 to 39.0)	2	13.2 (6.3 to 20.2)	0.80
Total	34	6.2 (0.8 to 39.1)	43	3.7 (0.9 to 34.5)	0.09
		Mcm-2 (%)		Mcm-2 (%)	
Meningiomas	19	8.2 (3.9 to 14.9)	27	6.4 (3.2 to 11.6)	0.34
Astrocytomas	4	6.5 (3.2 to 20.1)	4	6.9 (1.4 to 10.2)	0.99
Glioblastomas	8	30.0 (15.8 to 69.9)	10	29.5 (6.1 to 56.8)	0.72
Oligodendrogliomas	4	16.3 (2.4 to 41.0)	2	31.0 (22.9 to 39.0)	0.53
Total	36	14.3 (0.8 to 69.9)	43	8.0 (1.1 to 56.8)	0.31
		CD 105		CD 105	
Meningiomas	19	8.7 (7.2 to 11.5)	27	6.7 (3.2 to 11.5)	0.11
Astrocytomas	4	5.8 (6.0 to 7.0)	4	8.8 (6.0 to 12.0)	0.06
Glioblastomas	8	9.3 (7.0 to 8.0)	10	8.5 (6.0 to 11.0)	0.18
Oligodendrogliomas	4	8.5 (0.0 to 17.0)	2	14.8 (15.0 to 15.0)	0.53
Total	36	8.5 (1.5 to 15.6)	43	7.8 (0.0 to 15.0)	0.31

Data presented as median (minimum and maximum).

** p = Mann-Whitney

ICPRL = intracellular prolactin

Table 4 – Distribution of cases according to age, sex, tumor histological type and elevated serum PRL

Variable	Elevated serum PRL	Normal serum PRL	p*
	n=19	n=43	
Age	55 (15 to 84)	61 (26 to 86)	0.37
Women	13 (41%)	33 (77%)	0.14
Histological type			0.49
Meningioma	9 (47.4%)	26 (60.5%)	
Astrocytoma	2 (10.5%)	5 (11.6%)	
Glioblastoma	7 (36.8%)	8 (18.6%)	
Oligodendroglioma	1 (5.3%)	4 (9.3%)	

Data presented as median (minimum and maximum)

* p = Chi-square

PRL = prolactin

Table 5 – Values for cell proliferation (Ki-67 and Mcm-2) and angiogenesis (CD-105) markers in different histological types according to elevated and normal serum PRL

Histological type	Elevated Serum		Normal Serum		p**
	n	PRL	n	PRL	
		Ki-67 (%)		Ki-67 (%)	
Meningiomas	9	3.8 (1.3 to 12.5)	26	2.9 (0.7 to 12.8)	0.59
Astrocytomas	2	7.6 (3.0 to 12.3)	5	4.0 (2.6 to 20.2)	0.85
Glioblastomas	6	15.5 (6.0 to 34.5)	8	9.0 (4.4 to 19.9)	0.18
Oligodendrogliomas	1	18.5 (-)	3	11.4 (6.3 to 39.0)	0.80
Total	18	6.5 (1.3 to 34.5)	42	4.3 (0.7 to 39.0)	0.11
		Mcm-2 (%)		Mcm-2 (%)	
Meningiomas	9	7.6 (1.1 to 26.0)	26	4.5 (0.8 to 28.4)	0.67
Astrocytomas	2	8.6 (7.1 to 10.2)	5	5.9 (1.3 to 20.1)	0.38
Glioblastomas	7	34.3 (19.8 to 69.9)	8	28.6 (15.6 to 42.7)	0.23
Oligodendrogliomas	1	14.6 (-)	4	20.4 (2.4 to 41.0)	0.53
Total	19	10.2 (1.1 to 69.9)	43	8.0 (0.8 to 42.7)	0.12
		CD 105		CD 105	
Meningiomas	9	8.1 (0.0 to 12.0)	26	6.8 (0.0 to 14.0)	0.42
Astrocytomas	2	8.7 (6.0 to 12.0)	5	7.4 (6.0 to 10.0)	0.57
Glioblastomas	7	8.1 (7.0 to 12.0)	8	9.2 (6.0 to 12.0)	0.95
Oligodendrogliomas	1	6.1 (-)	4	13.0 (0.0 to 17.0)	0.53
Total	19	8.2 (0.0 to 12.0)	43	7.7 (0.0 to 17.0)	0.46

Data presented as median (minimum and maximum).

** p = Mann-Whitney

PRL = prolactin

Table 6 – Values for Ki-67, Mcm-2 and CD105 markers according to positive ICPRL and elevated serum PRL (Group 1), positive ICPRL or elevated serum PRL (Group 2) and negative ICPRL and normal serum PRL (Group 3)

Marker	n	Positive ICPRL and elevated serum PRL Group 1	n	Positive ICPRL or elevated serum PRL Group 2	n	Negative ICPRL and normal serum PRL Group 3	p***
Ki-67	8	11.6 (1.3 to 20.3)	29	4.8 (0.8 to 39.1)	23	3.3 (0.9 to 19.9)	0.009
Mcm-2	9	19.9 (3.9 to 69.9)	30	8.5 (0.8 to 41.0)	23	6.6 (1.1 to 42.8)	0.05
CD105	9	8.2 (6.0 to 12.0)	30	8.7 (0.0 to 17.0)	23	6.6 (0.0 to 15.0)	0.115

Data presented as median (minimum and maximum).

***p = Linear Regression

ICPRL = intracellular prolactin; PRL = prolactin.

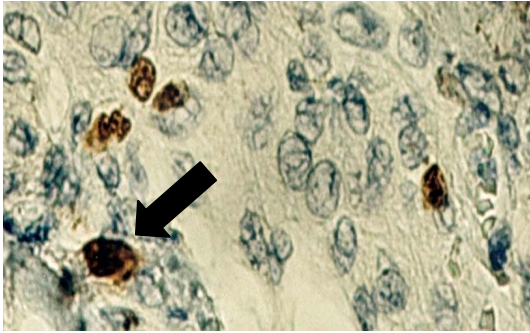
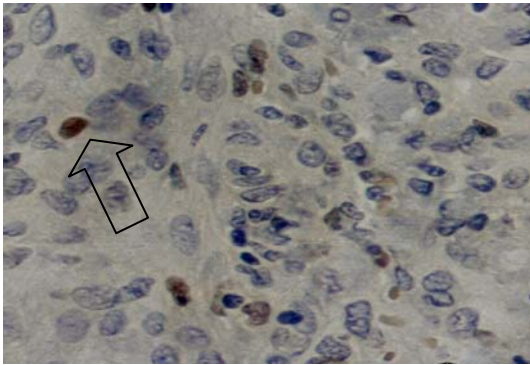
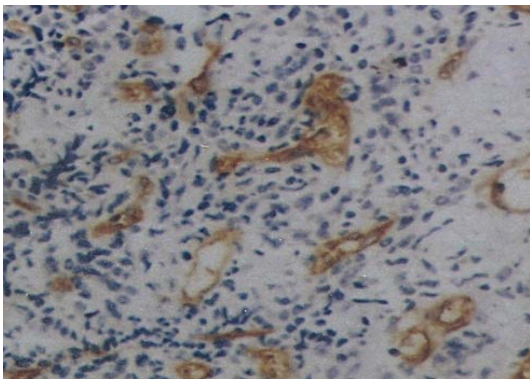
Figure 1**a****b****c**

Figure 1. (a) Nuclear immunopositivity for the Ki-67 antigen (black arrow); x400. (b) Positive nuclear expression for Mcm-2 (open arrow); x400. (c) Expression in vascular endothelial cells of the CD-105/endoglin marker (orange color); x200.

Figure 2

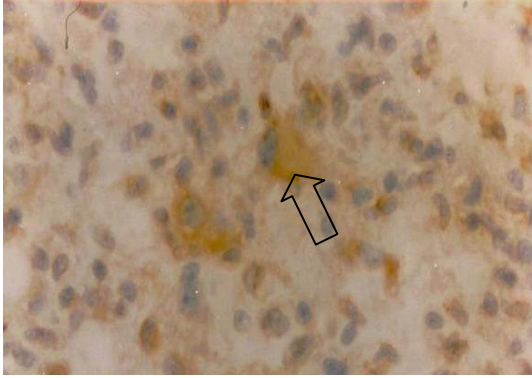


Figure 2. Cytoplasmic immunopositivity for intracellular prolactin (arrow); x400.

4 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS

Replicação celular e angiogênese em uma série de tumores do sistema nervoso central e sua relação com a expressão de prolactina tecidual e hiperprolactinemia

Abech DMD, Pereira-Lima JF, Leães CGS, Meurer RT, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP, Oliveira MC.

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

RESUMO

No desempenho de inúmeras funções orgânicas em diversos tecidos, a prolactina (PRL) exerce efeitos mitogênico, antiapoptótico, morfogênico, de atividade secretória e modulador da angiogênese. A expressão da PRL e de seu receptor está descrita em tecidos tumorais de mama, próstata e, mais recentemente, em tumores do sistema nervoso central. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da presença da PRL intracelular (PRLIC) e da hiperprolactinemia na replicação celular, utilizando a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para Ki-67 e Mcm-2, e angiogênese, utilizando IHQ para endoglin (CD-105), em tumores do sistema nervoso central de origem neuroepitelial (total de todos os casos 41,8%: 10,2% astrocitomas, 24% glioblastomas e 7,6% oligodendrogliomas) e das meninges (58,2% de todos os casos). As medianas dos índices Ki-67 e Mcm-2, quantificados como porcentagem de células marcadas, foram significativamente menores nos meningiomas quando comparados aos glioblastomas ($p < 0,001$ para Ki-67 e $p < 0,001$ para Mcm-2) e oligodendrogliomas ($p < 0,001$ para Ki-67 e $p = 0,02$ para Mcm-2). Foi observada boa correlação entre os marcadores de replicação Ki-67 e Mcm-2 ($r_s = 0,60$). Não foi observada diferença significativa na densidade vascular entre os diferentes tipos histológicos. A imuno-histoquímica para a PRLIC foi positiva em 45,6% dos tumores. A PRL sérica variou de 4 a 70 ng/ml e estava elevada em 33,9% dos casos. Quando avaliadas isoladamente, em modelo de regressão linear múltipla, não foi observado efeito importante da PRLIC e PRL sérica sobre os índices Ki-67 e Mcm-2 ou sobre a densidade vascular. Quando avaliado o impacto das variáveis PRLIC e PRL sérica combinadas sobre estes marcadores, observou-se uma elevação da densidade vascular nestes tumores assim como, aumento significativo dos marcadores de replicação celular ($p = 0,009$ para Ki-67 e $0,05$ para Mcm-2). A presença da PRL no tecido tumoral pode se constituir em fator modulador da proliferação celular e angiogênese no sistema nervoso central.

Palavras-chave: Ki-67; Mcm-2; Endoglina; Marcadores de replicação; Marcador de angiogênese; Prolactina; Tumores do sistema nervoso central.

INTRODUÇÃO

A prolactina (PRL) foi originalmente identificada como um hormônio neuroendócrino de origem hipofisária exclusiva. Contudo, recentemente, sua presença e secreção foram detectadas em tecidos não-hipofisários ^(1,2). Os principais sítios de produção extra-hipofisária da PRL são a decídua, o tecido mamário, os linfócitos-T, o cérebro e o endométrio.^(3,4) Da mesma forma, o receptor que media suas ações (R-PRL), já foi descrito no hipotálamo, plexo coróide e células do sistema imunológico⁽³⁾. Em tecidos tumorais, os R-PRL foram relatados em tumores de próstata, mama e alguns casos de tumores do SNC^(5,6,7,8).

Estão descritas mais de 300 diferentes funções orgânicas para a PRL em diversos tecidos⁽⁴⁾. Em nível celular, a PRL exerce efeito mitogênico, antiapoptótico, morfogênico, de atividade secretória e modulador da angiogênese ^(5,9).

A associação entre a PRL e risco de câncer de mama foi descrita por vários grupos^(10,11,12) e a expressão da PRL e do R-PRL também foi detectada no tecido prostático tumoral⁽¹³⁾, apresentando correlação positiva com o grau histológico do tumor⁽¹⁴⁾. Desta forma, evidências sugerem que a PRL estimula a proliferação, aumentando a motilidade e modulando a neovascularização em algumas linhagens de células tumorais^(5,13).

Em estudo recente demonstrou-se a presença tecidual de PRL e hiperprolactinemia em uma série de tumores do SNC⁽⁸⁾ o que motivou a busca de uma possível associação entre esses achados com a proliferação celular tumoral avaliada pelo antígeno Ki-67 e pela proteína mantenedora de minimicrosomo 2 (Mcm-2), e com a angiogênese, avaliada pela endoglina (CD-105).

PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal de 79 casos de tumores primários do sistema nervoso central, de origem neuroepitelial (41,8%) e das meninges (58,2%), submetidos à

excisão cirúrgica no Hospital São José da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brasil, num período de 40 meses. A idade dos pacientes variou entre 15 e 86 anos (idade média = 56,6 anos), sendo 67% dos pacientes do sexo feminino e 33% do sexo masculino. Com relação ao tipo histológico, 58,2% eram tumores das meninges enquanto 41,8% eram tumores de origem neuroepitelial. Quanto ao tipo histológico, os tumores de origem neuroepitelial estavam distribuídos em: astrocitomas (10,2%), glioblastomas (24%) e oligodendrogliomas (7,6%). A classificação e graduação dos tumores estudados, conforme os critérios da OMS⁽¹⁵⁾, encontram-se na Tabela 1.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), tendo os pacientes assinado consentimento e os autores termo de confidencialidade.

No dia anterior ao procedimento, foi coletada amostra de sangue periférico às 08:00 h para dosagem sérica de PRL (valores de referência dos kits de quimioluminescência para dosagem da PRL: 2-17 ng/mL e 3-29 ng/mL, respectivamente para homens e mulheres) e TSH (valores de referência do Kit para o TSH: 0,3-5,0 mUI/mL). Previamente à cirurgia, os pacientes responderam sobre a exposição a medicamentos que potencialmente aumentam os níveis séricos da PRL, que constituiu critério de exclusão. Também foram excluídos os pacientes portadores de tumores próximos a região selar e parasselar e aqueles com níveis séricos elevados de TSH.

O procedimento cirúrgico foi realizado em todos os pacientes por um mesmo neurocirurgião (F.N.P). Após o exame anátomo-patológico de rotina, uma porção do material fixado em parafina foi cortado (microtomia de 3µm) e preparado para a técnica de imuno-histoquímica. As lâminas foram analisadas por um mesmo patologista para a confirmação diagnóstica e determinação do tipo histológico e graduação do tumor, segundo critérios da Organização Mundial de Saúde⁽¹⁵⁾.

O método da estreptoavidina-biotina-peroxidase foi utilizado para a detecção das proteínas Ki-67 e Mcm-2, PRL intracelular e endoglin (CD-105). Os anticorpos primários utilizados foram anti-Ki67 (MIB-1, Dakocytomation, Glostrup, Denmark; dilution 1/150), anti-Mcm-2 (CRCT2.1, Novocastra, Newcastle, United Kingdom; dilution 1/30), anti-CD105 (4G11, Novocastra, Newcastle, United Kingdom; dilution 1/50) and anti-Prolactina (polyclonal, Dakocytomation, Glostrup, Denmark; ready for use). A recuperação antigênica para os anticorpos Mcm2 and CD-105 foi realizada com tris-EDTA (pH = 9.0) por 40 minutos, e para o Ki-67 com citrato de sódio (pH = 6.0) durante 30 minutos. Para a PRL intracelular não foi realizada recuperação antigênica. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio e de proteínas inespecíficas com albumina bovina. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com diaminobenzidina (DAB). Tonsila palatina foi utilizada como controle positivo para anti-Ki67, anti-Mcm-2 and anti-CD105, e prolactinoma para o anticorpo anti-prolactina. Como controles negativos foram utilizados os mesmos cortes sendo omitido o anticorpo primário.

Os índices Ki-67 e Mcm-2 foram calculados como porcentagem de núcleos marcados em aproximadamente 1000 células e expressos como a média da contagem de dois observadores (autores: Abech DMD and Pereira-Lima JF). Para avaliar a expressão da PRL intracelular (PRLIC) foi considerada positiva a presença inequívoca de 1% de células com citoplasma marcado em 300 células contadas⁽⁷⁾. A avaliação da microdensidade vascular (MDV) utilizando o anticorpo anti-CD105mAb foi determinada através da técnica de Chalkley, internacionalmente conhecida como critério *standart* para a avaliação da MDV⁽¹⁶⁾. As três áreas mais vascularizadas da lâmina foram identificadas como *hotspots*, subjetivamente escolhidas em cada lâmina após uma varredura em campo microscópico de baixa magnificação (x100). Através da interposição da grátula de Chalkley com 25 pontos randomizados, na maior magnificação (x200), sobre cada *hotspot*, eram considerados

microvasos contáveis o maior número de pontos da grátícula que coincidissem com os vasos marcados com a IHQ. A contagem de vasos marcados com endogлина foi realizada em 3 *hot spots* e expressa através da média das três contagens, também conhecida como índice de Chalkley ou microdensidade vascular média. Esse processo foi realizado por dois diferentes observadores, sendo utilizada para o resultado final a média do número de vasos contados por cada observador.

Na análise de variáveis quantitativas, devido à assimetria encontrada nos dados, utilizou-se mediana e valores mínimo e máximo. Na análise da concordância entre dois observadores utilizou-se o coeficiente de correlação intraclassa (ICC). Para comparar os valores dos marcadores ki-67, Mcm2, CD-105 entre os grupos com prolactina intracelular positiva e negativa, estratificando os diferentes tipos de tumores, usamos o teste de Mann-Whitney para cada estrato. Para avaliar o efeito combinado da prolactina intracelular e sérica sobre os marcadores de proliferação celular e angiogênese foi realizada regressão linear sobre dados transformados logaritmicamente. O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram analisados com o programa SPSS versão 15,0 para Windows.

RESULTADOS

Foi observada boa concordância na leitura entre os observadores da imuno-histoquímica, com valores do coeficiente de correlação intraclassa variando entre 0,96 a 0,99. A figura 1 evidencia positividade nuclear inequívoca dos marcadores Ki-67, Mcm-2 e CD-105 em tumores estudados.

A mediana do índice Ki-67 nos meningiomas, astrocitomas, glioblastomas e oligodendrogliomas foi de 3,0%, 4,7%, 10,4% e 18,6%, respectivamente, com diferença significativa entre os meningiomas e os glioblastomas ($p < 0,001$) e oligodendrogliomas ($p < 0,001$).

A mediana do índice Mcm-2, foi de 7,2%, 6,8%, 30% e 20,4%, respectivamente para os meningiomas, astrocitomas, glioblastomas e oligodendrogliomas, com diferenças significativas entre meningiomas e astrocitomas quando comparados aos glioblastomas ($p<0,001$ e $p<0,001$) e oligodendrogliomas ($p=0,02$ e $p=0,05$, respectivamente).

As medianas da densidade vascular observadas foram 8,1; 6,7; 9,2 e 12,8 respectivamente para os meningiomas, astrocitomas, glioblastomas e oligodendrogliomas, porém sem diferenças significativas entre os grupos.

Observou-se uma boa correlação entre Ki67 e Mcm-2 ($r_s=0,60$) e correlação menos intensa entre densidade vascular e Mcm-2 ($r_s=0,39$) e Ki-67 ($r_s=0,21$).

A imuno-histoquímica para a PRLIC foi positiva em 36 (45,6%) dos tumores. Não houve diferença significativa entre os grupos com e sem positividade para PRLIC com relação à idade, sexo e tipo histológico do tumor ou marcadores de proliferação celular e angiogênese (Tabelas 2 e 3). A figura 2 ilustra a imunopositividade para a PRLIC.

Os níveis séricos da PRL, avaliados em 62 pacientes, variaram de 4 a 70ng/ml, estando elevados em 19 casos (30,6%). Não foi observada diferença significativa em relação à idade, ao sexo e ao tipo histológico ou aos marcadores de proliferação celular e angiogênese entre os grupos de pacientes com a variável PRL sérica elevada e PRL sérica normal (Tabelas 4 e 5).

Isoladamente, PRLIC e a PRL sérica elevada, em modelo de regressão linear múltipla, não tiveram efeito sobre os índices Ki-67 e Mcm-2 e a densidade vascular. Embora sem diferença estatisticamente significativa, o índice Ki67 foi mais elevado em todos os tipos histológicos no grupo com PRL positiva associada à PRL sérica elevada.

Para avaliar possível impacto das variáveis PRLIC e PRL sérica de forma combinada sobre os marcadores de replicação celular e angiogênese, $n=62$, foram formados 3 grupos: grupo 1 = PRLIC positiva e hiperprolactinemia; grupo 2 = PRLIC ou

hiperprolactinemia e grupo 3 = PRLIC negativa e PRL sérica normal. Nesta análise observou-se uma tendência à elevação na densidade vascular na presença de PRLIC e/ou hiperprolactinemia, que alcançou aumento significativo para os índices Ki-67 e Mcm-2 (Tabela 6).

DISCUSSÃO

O índice Ki-67, que representa as células no ciclo celular, tem sido extensamente estudado e validado como um bom marcador de replicação celular^(17,18). Em alguns tumores do sistema nervoso central, como nos oligodendrogliomas, este índice apresenta boa relação com o grau e prognóstico tumoral^(19,20). Os valores do índice Ki-67, na presente série, mostraram-se semelhantes aos observados por outros estudos⁽²¹⁾, embora mais elevados nos oligodendrogliomas quando comparados à série de Wharton e cols.⁽¹⁹⁾.

Mais recentemente, tem sido utilizada para avaliar o ciclo celular a proteína mantenedora de minimicrosomo 2 (Mcm-2), que faz parte de um grupo de 6 proteínas mantenedoras que se reúnem em um complexo pré-replicação e que são essenciais na replicação das células eucarióticas⁽²²⁾. Utilizando Mcm-2 em oligodendrogliomas, Wharton e cols.⁽²³⁾ encontraram boa correlação deste marcador com outros índices de replicação, com o grau histológico do tumor e prognóstico.

Scott e cols.⁽²⁴⁾, em gliomas de diferentes graus, observaram um aumento significativo na expressão do Ki-67, Mcm-2 e ciclina A e B1, à medida que aumentava o grau do tumor, sugerindo que qualquer um deles tem potencial uso como marcadores do grau tumoral. O índice Mcm-2, no presente estudo, mostrou boa correlação com o índice Ki-67, com mediana mais elevada do Mcm-2 em todos os grupos de tumores estudados. Possivelmente este achado se deve ao fato do Mcm-2 ter capacidade de identificar também as

células que estejam na fase G1 para G0, diferente do marcador Ki-67 que identifica apenas as células no estágio G1⁽²⁵⁾.

O grau de angiogênese tumoral, medido através da densidade de microvasos, também tem sido utilizado como potencial marcador prognóstico e possível alvo terapêutico nos tumores de sistema nervoso central⁽²⁶⁾, particularmente para os gliomas. Contudo, os relatos da literatura relacionando o grau de angiogênese ao prognóstico dos gliomas têm sido conflitantes, em parte devido ao uso de marcadores pan-endoteliais, que não reagem especificamente com os neovasos, mas também com os vasos normais presentes no tumor⁽²⁷⁾. A superioridade do marcador de angiogênese CD-105 sobre os marcadores pan-endoteliais tem sido descrita na literatura para tumores de mama, pulmão e próstata^(28,29,30) e se deve ao fato do anticorpo se ligar preferencialmente às células endoteliais ativadas em tecidos angiogênicos.

A literatura descreve os glioblastomas como os tumores sólidos mais altamente vascularizados⁽³¹⁾. Lebelt e cols.⁽³²⁾, em estudo avaliando a angiogênese em gliomas, observaram densidade de microvasos mais elevada em glioblastomas e correlação significativa com os graus de malignidade. Diferente de outros tumores do SNC, a angiogênese nos oligodendrogliomas é pouco conhecida. Em recente estudo, Netto e cols.⁽³³⁾, encontraram diferença significativa na densidade de microvasos entre oligodendrogliomas grau II e III. Assimakopoulou e cols.⁽³⁴⁾, estudando a densidade de microvasos em tumores cerebrais, observaram contagem de microvasos significativamente mais elevada nas neoplasias astrocíticas de alto grau (III e IV) quando comparadas aos meningiomas, enquanto nos oligodendrogliomas uma densidade vascular menor foi observada. Na presente série, quando comparadas as medianas da densidade de microvasos, não observamos diferença significativa entre os diversos tipos tumorais.

Uma forte correlação entre o grau histológico, o índice Ki-67 e a extensão da vascularização do tumor, utilizando o marcador CD-105, foi observada por Barresi e cols.⁽³⁵⁾, em meningiomas. Nosso estudo não confirma esse resultado, pois observamos uma correlação fraca entre os marcadores de replicação e o de angiogênese.

Considerando o possível potencial terapêutico que pode advir com o maior domínio do processo da angiogênese tumoral, é de interesse o reconhecimento recente das ações proliferativas e estimulantes da angiogênese relacionadas à atividade da PRL, enquanto hormônio endócrino e autócrino/parácrino^(9,36). Neste sentido, o interesse por substâncias com potencial terapêutico de antagonizar as ações proliferativas da PRL extra-hipofisária seguiu-se à evidência de expressão tecidual do receptor da PRL em 80-90% dos carcinomas de mama, com maior expressão no tecido neoplásico do que no tecido adjacente ao tumor⁽³⁷⁾ e da expressão da PRL e ativação de stat5a/b em associação ao grau do tumor, em carcinoma de próstata⁽¹⁴⁾.

Já em tumores do sistema nervoso central, Leães e cols.⁽⁸⁾ evidenciaram uma correlação positiva entre os níveis séricos de PRL e a presença de PRL intracelular e um possível efeito modulador da PRL sobre a proliferação celular, avaliada pelo Ki-67. Na atual série, quando avaliado o impacto das variáveis PRLIC e PRL sérica combinadas sobre estes marcadores, observou-se uma tendência à elevação do número de vasos no tecido tumoral e aumento significativo dos marcadores de replicação celular

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo na literatura que avalia a influência da presença celular da PRL e o aumento de seus níveis séricos sobre o ciclo celular e a angiogênese em tumores do sistema nervoso central. Os achados de aumento na proliferação e angiogênese nos grupos com uma das variáveis PRL positivas (PRL intracelular ou hiperprolactinemia) e de tendência à elevação na densidade vascular e aumento significativo nos índices Ki67 e Mcm-2 quando ambas as variáveis eram positivas,

reforçam a sugestão de efeito modulador da PRL sobre a replicação celular e angiogênese em tecido tumoral. Do mesmo modo, abrem a possibilidade de estudos clínicos que investiguem possível evolução diferenciada nos pacientes com tumores do sistema nervoso central que sejam hiperprolactinêmicos e/ou que apresentem PRL nas células tumorais.

REFERÊNCIAS

1. Bachelot A, Binart N. Reproductive role of prolactin. *Reproduction*. 2007;133:361-9.
2. Goffin V, Binart N, Toraine P, Kelly PA. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:47-67.
3. Ben-Jonathan N, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev*. 1996;17:639-69.
4. Harris J, Stanford PM, Oakes SR, Ormandy CJ. Prolactin and the prolactin receptor: new targets of an old hormone. *Ann Med*. 2004;36(6):414-25.
5. Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev*. 2003;24(1): 1-27.
6. Leav I, Merk FB, Lee KF, Loda M, Mandoki M, McNeal JE, et al. Prolactin receptor expression in the developing human prostate and in hyperplasic, dysplasic, and neoplastic lesions. *Am J Pathol*. 1999; 154:863-70.
7. Ciccarelli E, Razzore P, Gaia D, Todaro C, Longo A, Forni M, et al. Hyperprolactinaemia and prolactin binding in benign intracranial tumors. *J Neurosurg*. 2001; 45:70-4.
8. Leães CGS, Pereira-Filho A, Pereira-Lima JFS, Dallago CM, Batista RL, Barbosa-Coutinho LM, Ferreira NP, Oliveira MC. Hyperprolactinemia and immunohistochemical expression of intracellular prolactin and prolactin receptor in primary central nervous system tumors and their relationship with cellular replication. *Brain Tumor Pathol*. 2007;24(2):41-6.
9. Ben-Jonathan N, Liby K, McFarland M, Zinger M. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(6):245-50.
10. Vonderhaar BK. Prolactin in human breast cancer development. In: Ethier SP, editor. *Endocrine oncology*. Totowa, NJ: Humana Press;2000. p. 101–20.

11. Tworoger SS, Eliassen AH, Sluss P, Hankinson SE. A prospective study of plasma prolactin concentrations and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:1482-8.
12. Hankinson SE, Willet WC, Michaud DS, Manson JE, Colditz GA, Longcope C, et al. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Nat Cancer Inst.* 1999;91(7):629-34.
13. Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen PM, Harkonen PL. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest.* 1997; 99:618-27.
14. Li H, Ahonen TJ, Alanen K, Xie J, LeBaron MJ, Pretlow TG, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 in human prostate cancer is associated with high histological grade. *Cancer Res.* 2004;64:4774-82.
15. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* 2007;114:97-109.
16. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002;38:1564-79.
17. Mckeever PE, Ross DA, Strawderman MS, Brunberg JA, Greenberg HS, Junck L. A comparison of the predictive power for survival in gliomas provided by MIB-1, bromodeoxyuridine and proliferating cell nuclear antigen with histopathologic and clinical parameters. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56:798-805.
18. Onda K, Davis RL, Shibuya M, Wilson CB, Hoshino T. Correlation between the bromodeoxyuridine labeling index and MIB-1 and Ki-67 proliferating cell indices in cerebral gliomas. *Cancer.* 1994;74:1921-6.
19. Wharton SB, Hamilton FA, Chan WK, Anderson JR. Proliferation and cell death in oligodendrogliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1998;24:21-8.

20. Reifenberger G, Kros JM, Burger PC, Louis DN, Collins VP. Oligodendroglioma. In: Kleihues P, Cavenee WK, editors. Pathology and genetics. Tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000. p. 56-61.
21. Haddad G, Al-Mefty O, Abdulrauf S. Meningiomas. In: Winn RH, editor. Youmans neurological surgery 5 th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2004. p. 1099-1128.
22. Lei M, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci.* 2002;114:1447-54.
23. Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001;27:305-13.
24. Scott IS, Morris LS, Rushbrook SM, Bird K, Vowlert SL, Burnet NG, et al. Immunohistochemical estimation of cell cycle entry and phase distribution in astrocytomas: applications in diagnostic neuropathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005;31:455-66.
25. Todorov IT, Werness BA, Wang HQ, Buddhharaju LN, Todorova PD, Slocum HK, et al. HsMCM2/BM28: a novel protein proliferation marker for human tumors and normal tissues. *Lab Invest.* 1998;78:73-8.
26. Jouanneau E. Angiogenesis and gliomas: current issues and development of surrogate markers. *Neurosurgery.* 2008;62(1)31-52.
27. Kumar P, Wang JM, Bernabeau C. CD 105 and angiogenesis. *J Pathology.* 1996; 178:363-6.
28. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD 105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 1999;59:856-61.
29. Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin Cancer Res.* 2001;7:3410-5.

30. Wikström P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate*. 2002;51:268-75.
31. Plake, KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58:313-20.
32. Lebelt A, Dzieciol J, Guzinska-Ustymowicz K, Lemancewicz D, Zimnoch L, Czykier E. Angiogenesis in gliomas. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(1):69-72.
33. Netto CG, Bleil CB, Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Immunohistochemical evaluation of the microvascular density through the expression of TGF-beta (CD 105/endoglin) and CD 34 receptors and expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in oligodendrogliomas. *Neuropathology*. 2008;28:17-23.
34. Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Papadakis N, Varakis I. Microvessel density in brain tumors. *Anticancer Res*. 1997;17:4747-53.
35. Barresi V, Cerasoli S, Vitarelli E, Tuccari G. Density of microvessels positive for CD105 (endoglin) is related to prognosis in meningiomas. *Acta Neuropathol*. 2007;114:147-56.
36. Tallet E, Rouet V, Jomain JB, Kelly PA, Bernichtein S, Goffin V, et al. Rational design of competitive prolactin/growth hormone receptor antagonist. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008;13:105-17.
37. Llovera M, Pichard P, Bernichtein S, Jeay S, Touraine P, Kelly PA, et al. Human prolactin antagonists inhibit hPRL-activating signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*. 2000;19:4695-4705.

Tabela 1 – Classificação histológica dos tumores

Tipo histológico	n	Grau
Meningiomas		
Meningotelial	11	I
Fibroblástico	9	I
Transicional	9	I
Psamomatoso	5	I
Angiomatoso	6	I
Microcístico	1	I
Secretor	1	I
Atípico	4	II
Astrocitoma		
Pilocítico	2	I
Difuso	2	II
Anaplásico	4	III
Oligodendroglioma	2	II
Oligodendroglioma anaplásico	4	III
Glioblastoma	19	IV

Tabela 2. Dados relativos à distribuição dos casos com relação à mediana de idade, sexo e tipo histológico do tumor e a positividade da PRLIC

	PRLIC positiva	PRLIC negativa	
Variável	n=36	n=43	p*
Idade	57 (15 to 84)	60 (26 to 86)	0.54
Sexo feminino	20 (56%)	33 (77%)	0.08
Tipo histológico			0.68
Meningioma	19 (53%)	27 (63%)	
Astrocitoma	4 (11%)	4 (9%)	
Glioblastoma	9 (25%)	10 (23%)	
Oligodendroglioma	4 (11%)	2 (5%)	

Dados apresentados como mediana (mínimo e máximo)

* p = Qui-quadrado

PRLIC = prolactina intracelular

Tabela 3 - Valores dos marcadores de proliferação celular (Ki-67 and Mcm-2) e angiogênese (CD-105) nos diferentes tipos histológicos de acordo com a variável PRLIC positiva e negativa

Tipo Histológico	n	PRLIC positiva	n	PRLIC negativa	p**
		Ki-67 (%)		Ki-67 (%)	
Meningiomas	19	3.5 (0.8 a 12.9)	27	3.0 (0.9 a 9.8)	0.47
Astrocitomas	4	12.1 (2.6 a 35.0)	4	4.1 (2.6 a 12.2)	0.49
Glioblastomas	9	10.5 (6.0 a 20.3)	10	9.8 (2.3 a 34.0)	0.76
Oligodendrogliomas	4	18.5 (11.4 a 39.0)	2	13.2 (6.3 a 20.2)	0.80
Total	34	6.2 (0.8 a 39.1)	43	3.7 (0.9 a 34.5)	0.09
		Mcm-2 (%)		Mcm-2 (%)	
Meningiomas	19	8.2 (3.9 a 14.9)	27	6.4 (3.2 a 11.6)	0.34
Astrocitomas	4	6.5 (3.2 a 20.1)	4	6.9 (1.4 a 10.2)	0.99
Glioblastomas	8	30.0 (15.8 a 69.9)	10	29.5 (6.1 a 56.8)	0.72
Oligodendrogliomas	4	16.3 (2.4 a 41.0)	2	31.0 (22.9 a 39.0)	0.53
Total	36	14.3 (0.8 a 69.9)	43	8.0 (1.1 a 56.8)	0.31
		CD 105		CD 105	
Meningiomas	19	8.7 (7.2 a 11.5)	27	6.7 (3.2 a 11.5)	0.11
Astrocitomas	4	5.8 (6.0 a 7.0)	4	8.8 (6.0 a 12.0)	0.06
Glioblastomas	8	9.3 (7.0 a 8.0)	10	8.5 (6.0 a 11.0)	0.18
Oligodendrogliomas	4	8.5 (0.0 a 17.0)	2	14.8 (15.0 a 15.0)	0.53
Total	36	8.5 (1.5 a 15.6)	43	7.8 (0.0 a 15.0)	0.31

Dados apresentados como mediana (mínimo and máximo).

** p = Mann-Whitney

PRLIC = prolactina intracelular

Tabela 4 – Dados relativos à distribuição dos casos com relação à mediana de idade, sexo e tipo histológico do tumor e prolactina sérica elevada

	PRL sérica elevada	PRL sérica normal	
Variável	n=19	n=43	p*
Idade	55 (15 to 84)	61 (26 to 86)	0.37
Sexo feminino	13 (41%)	33 (77%)	0.14
Tipo Histológico			0.49
Meningioma	9 (47.4%)	26 (60.5%)	
Astrocitoma	2 (10.5%)	5 (11.6%)	
Glioblastoma	7 (36.8%)	8 (18.6%)	
Oligodendroglioma	1 (5.3%)	4 (9.3%)	

Dados apresentados como mediana (mínimo e máximo).

* p = Qui-quadrado

Tabela 5 – Valores dos marcadores de proliferação celular (Ki-67 and Mcm-2) e angiogênese (CD-105) nos diferentes tipos histológicos para as variáveis PRL sérica elevada e normal

Tipo Histológico	n	PRL sérica		n	PRL sérica	
		elevada			normal	p**
		Ki-67 (%)			Ki-67 (%)	
Meningiomas	9	3.8 (1.3 a 12.5)	26	2.9 (0.7 a 12.8)	0.59	
Astrocitomas	2	7.6 (3.0 a 12.3)	5	4.0 (2.6 a 20.2)	0.85	
Glioblastomas	6	15.5 (6.0 a 34.5)	8	9.0 (4.4 a 19.9)	0.18	
Oligodendrogliomas	1	18.5 (-)	3	11.4 (6.3 a 39.0)	0.80	
Total	18	6.5 (1.3 a 34.5)	42	4.3 (0.7 a 39.0)	0.11	
		Mcm-2 (%)			Mcm-2 (%)	
Meningiomas	9	7.6 (1.1 a 26.0)	26	4.5 (0.8 a 28.4)	0.67	
Astrocitomas	2	8.6 (7.1 a 10.2)	5	5.9 (1.3 a 20.1)	0.38	
Glioblastomas	7	34.3 (19.8 a 69.9)	8	28.6 (15.6 a 42.7)	0.23	
Oligodendrogliomas	1	14.6 (-)	4	20.4 (2.4 a 41.0)	0.53	
Total	19	10.2 (1.1 a 69.9)	43	8.0 (0.8 a 42.7)	0.12	
		CD 105			CD 105	
Meningiomas	9	8.1 (0.0 a 12.0)	26	6.8 (0.0 a 14.0)	0.42	
Astrocitomas	2	8.7 (6.0 a 12.0)	5	7.4 (6.0 a 10.0)	0.57	
Glioblastomas	7	8.1 (7.0 a 12.0)	8	9.2 (6.0 a 12.0)	0.95	
Oligodendrogliomas	1	6.1 (-)	4	13.0 (0.0 a 17.0)	0.53	
Total	19	8.2 (0.0 a 12.0)	43	7.7 (0.0 a 17.0)	0.46	

Dados apresentados como mediana (mínimo e máximo).

** p = Mann-Whitney

PRL = prolactina

Tabela 6 – Valores para os marcadores Ki-67, Mcm-2 e CD105 e sua relação com as variáveis PRLIC positiva e PRL sérica elevada (Grupo 1), PRLIC positiva ou PRL sérica elevada (Grupo 2) e PRLIC negativa e PRL sérica normal (Grupo 3)

Marcador	n	PRLIC positiva e PRL sérica elevada Grupo 1	n	PRLIC positiva ou PRL sérica elevada Grupo 2	n	PRLIC negativa e PRL sérica normal Grupo 3	p***
Ki-67	8	11.6 (1.3 a 20.3)	29	4.8 (0.8 a 39.1)	23	3.3 (0.9 a 19.9)	0.009
Mcm-2	9	19.9 (3.9 a 69.9)	30	8.5 (0.8 a 41.0)	23	6.6 (1.1 a 42.8)	0.05
CD105	9	8.2 (6.0 a 12.0)	30	8.7 (0.0 a 17.0)	23	6.6 (0.0 a 15.0)	0.115

Dados apresentados como mediana (mínimo and máximo).

*** p = Regressão Linear

PRLIC = prolactina intracelular; PRL = prolactina

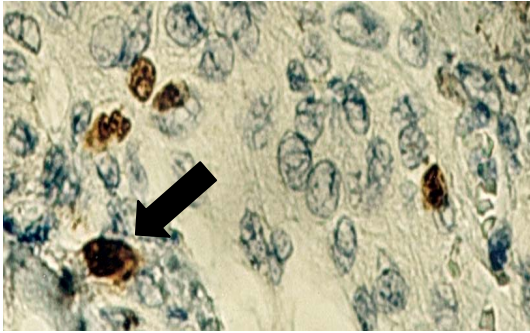
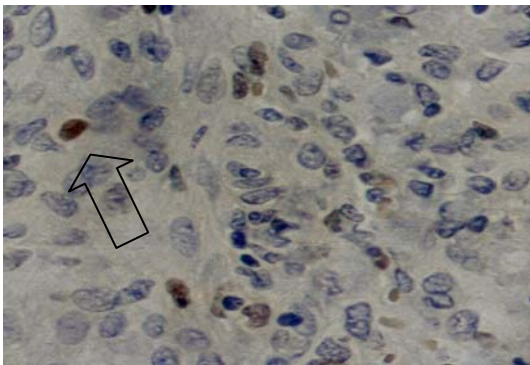
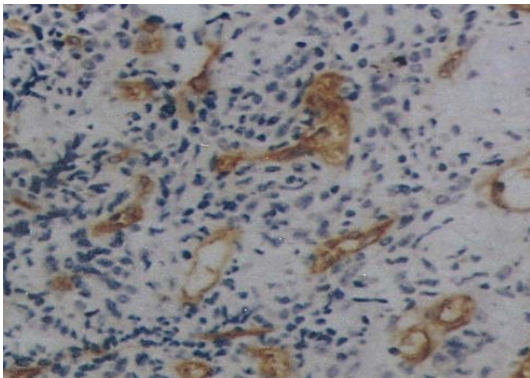
Figura 1**a****b****c**

Figura 1. (a) Imunopositividade nuclear para o antígeno Ki-67 (seta preta); x400. (b) Expressão nuclear positiva para o Mcm-2 (seta aberta); x400. (c) Imunopositividade para o marcador CD-105/endoglina (cor laranja); x200.

Figura 2

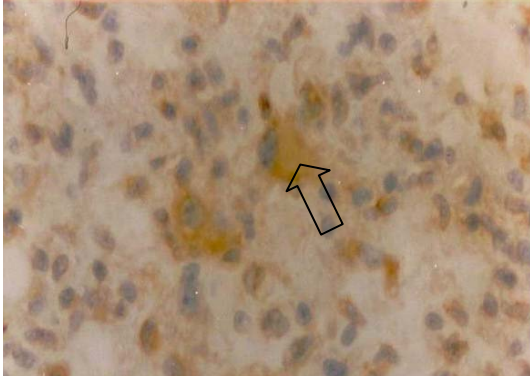


Figura 2. Imunopositividade para a prolactina intracelular, nota-se presença inequívoca de células com citoplasma marcado (seta); x400.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para os diferentes tipos tumorais os valores do índice de replicação celular Ki-67 e Mcm-2 mostraram-se semelhantes aos observados na literatura exceto nos oligodendrogliomas onde o índice Ki-67 foi mais elevado.

Em todos os grupos de tumores o marcador de replicação celular Mcm-2 apresentou boa correlação com o índice Ki-67, com valores mais elevados de mediana para o índice Mcm-2.

Não observou-se diferença significativa entre os diversos grupos tumorais nas medianas da densidade de microvasos.

A expressão da prolactina intracelular foi detectada em 45,6% dos casos. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes que apresentaram positividade para esta variável com relação à idade, ao sexo e ao tipo histológico do tumor ou aos marcadores de proliferação celular e angiogênese.

Níveis séricos elevados da prolactina foram observados em 19 de 62 casos avaliados (30,6%). Não houve diferença significativa em relação à idade, ao sexo e ao tipo histológico ou aos marcadores de proliferação celular e angiogênese entre os grupos com relação à variável prolactina sérica.

Observou-se que, analisado isoladamente, o índice Ki67 esteve sempre mais elevado nos grupos com presença de PRL intracelular ou hiperprolactinemia. Quando essas variáveis foram consideradas em conjunto houve tendência a aumento na angiogênese e aumento significativo nos índices de replicação celular.

5.1 CONCLUSÃO FINAL

As variações observadas na replicação celular e angiogênese na presença de PRL intracelular e hiperprolactinemia sugerem participação da prolactina entre os fatores moduladores destas ações.

Novos estudos elucidarão o papel da prolactina na tumorigênese ou manutenção de tumores do sistema nervoso central, sua interferência na replicação celular e angiogênese, bem como possíveis implicações prognósticas e terapêuticas desses achados.

6 ANEXOS

ANEXO A. Parecer do CEP da Santa Casa de Porto Alegre



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 285 - Telefone: (51) 3214.8080 - Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90020-090 - Porto Alegre - Rio Grande do Sul - CNPJ: 92815063/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br - E-mail: marketing@santacasa.tc.br



Compromisso com a excelência

PARECER CONSUBSTANCIADO

Protocolo nº 1814/08

Parecer complementar nº 108/08

Título: "Expressão imunoistoquímica de receptores de prolactina, prolactina intracelular e relação de angiogênese e proliferação celular em tumores primários do sistema nervoso central".

Pesquisador Responsável: Miriam da Costa Oliveira

Instituição onde se realizará – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Data de Entrada: 11/03/08

II- Objetivos – Avaliar as concentrações séricas de prolactina e a presença da expressão de receptores de prolactina, prolactina intracelular, marcador de angiogênese e marcador de proliferação celular em tumores primários do SNC.

III - Sumário do Projeto:

Descrição e caracterização da amostra: O presente estudo trata-se de um estudo transversal. Será avaliado o material anátomo patológico obtido de pacientes adultos, de ambos os sexos, submetidos à excisão cirúrgica de tumor primário do SNC, no Hospital São José, no período de outubro de 2003 a janeiro de 2007. A época do procedimento cirúrgico todos os pacientes responderam a uma anamnese de rotina e a um questionário relativo à exposição a medicamentos que potencialmente aumentam os níveis séricos da prolactina, conforme protocolo em anexo (Anexo 1).

Crítérios de inclusão: Será incluído no estudo o material anátomo patológico obtido de pacientes que tenham sido submetidos à excisão cirúrgica de tumor primário de SNC, no Hospital São José, com Termo de Consentimento assinado cujo modelo encontra-se no Anexo 2 deste projeto, durante o período de outubro de 2003 a janeiro de 2007.

Crítérios de exclusão: Será excluído deste estudo o material anátomo patológico de pacientes portadores de tumor secundário de SNC, de tumores localizados na região selar, o material dos pacientes que, conforme dados obtidos no questionário do Anexo 1, estavam expostos a medicamentos que potencialmente aumentam a prolactina sérica e o material de pacientes que não assinaram o Termo de Consentimento.

Adequação das condições - Hospital escola com infra-estrutura adequada para a realização do estudo descrito.

IV -Comentários:

- Justificativa do uso de placebo - Não se aplica no presente estudo.

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/SCMPA Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tc.br
 Reconhecido: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP / Ministério da Saúde
 IRB - Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002309
 FWA - Federalwide Assurance sob número - FWA00002949



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 285 - Telefone: (51) 3214.8080 - Fax: (51) 3214.8585
 CEP 90020-090 - Porto Alegre - Rio Grande do Sul - CNPJ: 92815000/0001-68
 Site: www.santacasa.org.br - E-mail: marketing@santacasa.tche.br



Compromisso com a excelência

- Análise de riscos e benefícios - São apresentados no TCLE.
 - Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo - Apresenta-se adequado.
 - Informação adequada quanto ao financiamento - Os kits de imunohistoquímica e marcadores de angiogênese e proliferação celular serão subsidiados pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA.
 - Outros centros no caso de estudos multicêntricos - O estudo será realizado na ISCMPA e UFCSPA.
- V - Parecer** - "Após reavaliação das alterações acima descritas, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição".

VI - Data da Reunião: 01/04/2008.

VII - Data da Reavaliação: 16/04/2008.

"Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Aprovados".

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Porto Alegre, 16 de Abril de 2008.

Dr. Cláudio Teloken
 Coordenador do CEP/ISCMPA

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/ISCMPA Fone/Fax (51) 3214-8571 - e-mail: cep@santacasa.tche.br
 Reconhecido: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP / Ministério da Saúde
 IRB - Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509
 FWA - Federalwide Assurance sob número - FWA00002949

Parecer complementar 108/08

ANEXO B. Parecer do CEP da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEP COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Protocolo para apresentação de Projeto de Pesquisa aprovado pelo
CEP ISCMPA**

Data de recebimento CEP UFCSPA	Número
21/07/2009	009/09

Nome do projeto: Expressão Imunoistoquímica de receptores de prolactina intracelular e relação de angiogênese e proliferação celular em tumores primários do sistema nervoso central

Autores: Denise Maria Dotta Abech, Miriam da Costa Oliveira, Júlia Fernanda Pereira Lima

Protocolo: 1814/08

Parecer: 108/08

Data de Aprovação no CEP ISCMPA: 16/04/2008

Secretaria CEP UFCSPA

Edi C. Pulcinella
Secretária do CEP/UFCSPA

ANEXO C. Questionário relativo à exposição**HIPERPROLACTINEMIA E PROLACTINA INTRACELULAR NOS TUMORES
PRIMÁRIOS DO SNC****PROTOCOLO DE INTERNAÇÃO**

ETIQUETA

Caso número: _____

Identificação

- Nome: _____
- Sexo: _____ 1 – Masc 2 - Fem
- Idade: _____
- Prontuário: _____
- Endereço e tel: _____

Dados clínicos

- Drogas : _____
- Último parto (__/__/__) • DUM (__/__/__) • Libido/função sexual: _____
- Data da cirurgia: _____
- Sintomas pré-cirurgia: _____
- Exame de imagem pré-cirúrgico: _____

Laboratório

- PRL sérica: _____

ANEXO D. Técnica de imuno-histoquímica

1. cortar o bloco de parafina com uma espessura de 3 micrômetros;
2. colocar o corte na lâmina preparada com organolisano;
3. desparafinar: deixar a lâmina na estufa a aproximadamente 70° C por 30 minutos;
deixar a lâmina de molho no xilol por 5 minutos; passar a Lâmina por 6 vezes no álcool absoluto para retirar o xilol; lavar a lâmina em água destilada;
4. aquecer a solução de citrato de sódio (pH 6,0) em banho-maria até 92° C e colocar as lâminas nessa solução, deixando-as por 40 minutos;
5. deixar esfriar por 5 minutos à temperatura ambiente;
6. lavar em água destilada corrente;
7. colocar a lâmina em solução de água oxigenada 30 volumes (5mL) e metanol (95mL) durante 10 minutos por duas vezes;
8. lavar a lâmina em água destilada;
9. lavar a lâmina em PBS (phosphate buffered saline), por 5 minutos duas vezes;
10. deixar o excesso de líquido escorrer das lâminas e secar o excesso com papel filtro (ao redor do tecido)
11. delimitar o corte com caneta DAKO-pen (uma a uma);
12. pingar soro normal de cavalo em diluição 1/100 e deixar por 30 minutos;
13. deixar escorrer o excesso de soro;
14. aplicar o anticorpo específico, na diluição desjada, cobrindo todo o tecido;
15. deixar em câmara úmida coberta na geladeira (4°C) durante a noite;
16. lavar com PBS duas vezes por 5 minutos;
17. aplicar anticorpo secundário biotilado do Kit LSAB da DAKO (Kit inuversal, pronto para uso) cobrindo todo o tecido e deixar por 30 minutos em estufa a 37°C;
18. lavar com PBS duas vezes por 5 minutos;

19. aplicar StrepA-B do Kit LSAB cobrindo todo o tecido e deixar por 30 minutos em estufa a 37° C;
20. lavar com PBS duas vezes por 5 minutos;
21. preparar o cromógeno DAB (diaminobenzina) (100 mL de PSB, 60 mg de DAB e 1mL de água oxigenada a 30 volumes);
22. aplicar cromógeno DAB, cobrindo todo o tecido e deixar por 5 minutos;
23. lavar em água destilada por 5 minutos;
24. contra-corar com hematoxilina por 30 segundo;
25. lavar em água corrente;
26. passar as lâminas em álcool absoluto por 4 vezes, deixando por 5 minutos no último recipiente com álcool absoluto;
27. passar as lâminas no xilol;
28. montar as lâminas com lamínula utilizando entellan.