

**FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO**

**ALEGRE – FFFCMPA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**MESTRADO EM PATOLOGIA GERAL E EXPERIMENTAL**

**HIPERPROLACTINEMIA E EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE  
PROLACTINA INTRACELULAR E DE RECEPTORES DE PROLACTINA EM  
TUMORES PRIMÁRIOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E RELAÇÃO DOS  
ACHADOS COM A REPLICAÇÃO CELULAR**

**CAROLINA GARCIA SOARES LEÃES**

**PORTO ALEGRE**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Hiperprolactinemia e expressão imunoistoquímica de prolactina intracelular e de receptores de prolactina em tumores primários do sistema nervoso central e relação dos achados com a replicação celular**

**Carolina Garcia Soares Leães**

Dissertação de Mestrado em Patologia Geral e Experimental  
da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto  
Alegre – RS

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam da Costa Oliveira**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lígia Barbosa Coutinho**

**Pesquisadores Associados:**

**Prof. Dr. Nelson Pires Ferreira**

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima**

Porto Alegre

2006

## SUMÁRIO

1. Lista de abreviações e siglas.....	6
2. Introdução.....	7
3. Revisão da literatura.....	9
Parte I – Conhecimento atual sobre as variáveis em estudo.....	9
3.1 Prolactina (PRL): da fisiologia à doença.....	9
3.1.1 Estrutura da PRL.....	9
3.1.2 Lactotrofos.....	10
3.1.3 Regulação da secreção de PRL.....	11
3.1.4 Fisiologia da secreção de PRL.....	14
3.1.5 Ações da PRL.....	14
3.1.6 Epidemiologia da hiperprolactinemia.....	17
3.1.7 Causas fisiológicas de hiperprolactinemia.....	17
3.1.8 Causas patológicas de hiperprolactinemia.....	19
3.1.9 Manifestações clínicas da hiperprolactinemia.....	24
3.1.10 Tratamento da hiperprolactinemia.....	25
3.2 Receptor de prolactina (R-PRL).....	26
3.2.1 Generalidades.....	26
3.2.2 Gene responsável.....	27
3.2.3 Descrição do R-PRL e suas isoformas.....	27
3.2.4 Mecanismo de ação e sinalização.....	28
3.2.5 Distribuição tecidual.....	30
3.2.6 Detecção do R-PRL.....	31
3.3 Marcador de replicação celular: MIB-1.....	32
3.3.1 O ciclo celular.....	32
3.3.2 Detecção – métodos não imunoistoquímicos.....	34
3.3.3 Detecção – métodos imunoistoquímicos.....	36

3.4 Tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC).....	42
3.4.1 Conceito e epidemiologia.....	42
3.4.2 Classificação histológica.....	44
3.4.3 Características dos principais tumores do SNC.....	51
3.4.4 Fatores de risco.....	56
3.4.5 Manifestações clínicas.....	58
3.4.6 Diagnóstico.....	59
3.4.7 Tratamento.....	62
Parte II – Inter-relação entre as variáveis em estudo e o sistema nervoso central....	63
3.5 PRL extra-hipofisária.....	63
3.6 Receptor de PRL.....	64
3.7 PRL, receptores hormonais e tumores primários do SNC.....	64
3.8 MIB-1 e tumores primários do SNC.....	67
4. Objetivos.....	69
4.1 Objetivo geral.....	69
4.2 Objetivos específicos.....	69
5. Referências bibliográficas.....	70
6. Artigo científico redigido em português.....	98
7. Artigo científico redigido em inglês.....	121
8. Anexos.....	143

## SUMÁRIO DE TABELAS E FIGURAS

### **Tabelas**

Tabela 1. Fatores inibidores da PRL.....	11
Tabela 2. Fatores liberadores da PRL.....	12
Tabela 3. Causas fisiológicas de hiperprolactinemia.....	18
Tabela 4. Causas patológicas de hiperprolactinemia.....	20
Tabela 5. Drogas associadas à hiperprolactinemia.....	23
Tabela 6. Classificação histológica dos tumores do SNC pela OMS.....	45
Tabela 7. Gradação dos tumores de células gliais.....	51
Tabela 8. Manifestações clínicas dos tumores cerebrais.....	59

### **Figuras**

Figura 1. Mecanismo de ação do R-PRL.....	28
Figura 2. Representação esquemática do ciclo celular.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*): quinase reguladora da sinalização extracelular

FSH: Hormônio folículo-estimulante

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*): Fator de crescimento semelhante à insulina – I

II: Imunoistoquímica

KDa: Quilodáton

LH: Hormônio luteinizante

MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*): proteína quinase ativadora de mitogênese

OMS: Organização Mundial da Saúde

PEG: polietilenoglicol

PRL: Prolactina

PCR: reação em cadeia da polimerase

R-PRL: Receptor de prolactina

PTTG1 (*PituitaryTumor-transforming Gene*): gene transformador de tumor hipofisário

SNC: Sistema nervoso central

TRH: Hormônio liberador da tireotrofina

TSH: Hormônio estimulador da tireóide

## 1. INTRODUÇÃO

A carcinogênese resulta da perda progressiva dos mecanismos de controle do ciclo celular e é influenciada por aspectos genéticos, ambientais, dietéticos e hormonais. Apesar dos hormônios não funcionarem como carcinógenos, eles podem promover o crescimento das células que sofreram mutação interagindo com fatores de crescimento e oncogenes, e atuar na transformação maligna, na proliferação e na progressão tumorais (Ben-Jonathan *et al.*, 2002).

O papel dos hormônios esteróides sexuais nos cânceres de tecido reprodutivo está bem estabelecido (McGuire *et al.*, 1992; Miller & Langdon, 1997; Balfé *et al.*, 2004), mas a contribuição da prolactina (PRL) ainda é controversa. A PRL é um hormônio neuroendocrinológico versátil que também age localmente via produção de citocinas. Ela acumula diversas funções, incluindo iniciação e manutenção da lactação, desenvolvimento da glândula mamária, imunomodulação, osmorregulação e alterações de comportamento parental e reprodutivo (Ben-Jonathan *et al.*, 2002). Em relação à função celular, a PRL altera as atividades secretórias, mitogênicas e morfogênicas. A diversidade das ações da PRL reflete seu polimorfismo estrutural, produção e processamento locais, suas distintas isoformas de receptor, inúmeros genes-alvo e vias de sinalização intracelulares (Ben-Jonathan *et al.*, 2002).

Desde a primeira descrição de um caso de glioma, em meados do século 19, obteve-se um grande progresso sobre a fisiopatogenia dos tumores do sistema nervoso central (SNC), mas apenas discreta melhora na sobrevivência desses pacientes. Essa discrepância, ao lado de avanços significativos no tratamento de muitos outros cânceres, inspira a reavaliação da gênese das células gliais e dos mecanismos associados à carcinogênese glial.



Com efeito, a expressão tumoral de receptores hormonais representa um novo alvo molecular no entendimento da etiologia e no tratamento das neoplasias em geral.

Quanto à PRL, observa-se que a literatura que a associa com tumores do SNC é escassa e baseada essencialmente em dados experimentais e relatos de casos. Existem evidências sugerindo que o aumento da PRL, observado em alguns desses tumores, esteja relacionado com a gênese tumoral e não resulte apenas de efeito compressivo local provocado pelos tumores cerebrais. A presença de receptores de PRL nessas neoplasias, bem como a mitogênese provocada pela PRL nos estudos experimentais, estimulam a investigação sobre a relevância clínica e eventual potencial terapêutico dessa associação, sendo necessários, para o melhor entendimento dessa inter-relação, novos estudos de séries clínicas e imunoistoquímicas.

Neste contexto, o atual estudo objetivou a avaliação da PRL, quer a partir de seus níveis séricos, quer a partir de sua presença intracelular e da expressividade de seu receptor, em tecido tumoral do SNC. Para tanto, o tema será desenvolvido em dois blocos: no primeiro, descreve-se o conhecimento básico atual sobre cada variável contemplada no trabalho; no segundo, relata-se a inter-relação entre a PRL, os receptores de PRL e o índice Ki-67 especificamente no ambiente do SNC.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### PARTE I - CONHECIMENTO ATUAL SOBRE AS VARIÁVEIS EM ESTUDO

#### 3.1. Prolactina: da fisiologia à doença

##### 3.1.1 Estrutura da PRL

A PRL é um hormônio polipeptídico sintetizado e secretado pelas células lactotróficas da hipófise anterior (Nogueira, 2002). Shome e Parlow definiram a sequência completa de 198 aminoácidos da PRL humana em 1977 (Shome & Parlow, 1977).

O gene da PRL, localizado no cromossomo 6, integra a superfamília de genes de hormônios polipeptídicos, juntamente com o hormônio do crescimento e o hormônio lactogênico placentário (Nogueira, 2002). O gene da PRL apresenta 10Kb e é composto por 5 éxons e 4 íntrons. Sua transcrição é regulada por duas regiões independentes, uma proximal, responsável pela expressão hipofisária específica, e uma terminal, responsável pela expressão extra-hipofisária (Freeman *et al.*, 2000).

Existem diversas formas de PRL circulantes. A forma monomérica da PRL, de peso molecular de 23 kilodáltons (KDa), representa a maior parte da PRL circulante (80-90%) e é biologicamente ativa. As outras isoformas de alto peso molecular, *Big* PRL (50-60KDa) e *Big-Big* PRL (150-170KDa), compreendem 10-20% da PRL circulante, são compostas de PRL ligada a imunoglobulinas e apresentam pouca ou nenhuma bioatividade (Nogueira, 2002). *Big-big* prolactina é também denominada de macroprolactina e, apesar de ser considerada biologicamente inativa, ela apresenta imunorreatividade nos ensaios

comerciais disponíveis para mensuração de PRL por anticorpos imunoglobulina G (IgG) (Suliman *et al.*, 2003).

### **3.1.2 Lactotrofos**

Os lactotrofos, células responsáveis pela produção de PRL, representam 15% das células da adeno-hipófise e são o último tipo celular a se diferenciar na hipófise fetal, com doze semanas de gestação (Asa *et al.*, 1986; Asa *et al.*, 1988). Estas células estão distribuídas nas porções póstero-medial e póstero-lateral do lobo anterior. Por métodos convencionais, os lactotrofos são células acidófilas, indistinguíveis dos somatotrofos. A imunoistoquímica revela duas formas distintas deste tipo celular: as células densamente granuladas e as esparsamente granuladas. Postula-se que as densamente granuladas são as que armazenam o hormônio e as esparsamente granuladas as formas ativamente secretoras (Asa *et al.*, 1995). Os lactotrofos variam com a idade, sexo e, na mulher, com o número de gestações. Em homens e mulheres nulíparas, o número de lactotrofos varia de 8,6 a 31,3% do total das células constituintes da hipófise, com média de 16,9% (Asa *et al.*, 1982). No feto e recém-nascido, como na gravidez e na lactação, há uma hiperplasia dos lactotrofos atribuída à exposição aos estrógenos, ocasionando um aumento da glândula hipofisária composto predominantemente de pequenas células esparsamente granuladas (Scheithauer *et al.*, 1990). A PRL é também sintetizada em menor grau em diversos sítios extra-hipofisários, incluindo decídua placentária, miométrio, mama, próstata e células imunológicas, como linfócitos T e B e macrófagos (Ben-Jonathan *et al.*, 1996).

### 3.1.3 Regulação da secreção de PRL

Dezenas de fatores inibidores e ativadores têm sido descritos na regulação da síntese e secreção da PRL, em sua maioria hipotalâmicos (Tabelas 1 e 2) (Zhang *et al.*, 1999; Molitch, 2002). Ao contrário dos demais hormônios hipofisários, o controle hipotalâmico da secreção de PRL é predominantemente inibitório. A dopamina é o fator mais importante neste processo. Além de inibir a secreção de PRL, a dopamina suprime a expressão do gene da PRL e a proliferação de lactotrofos. Ela é sintetizada primariamente no SNC, e em menor proporção na medula adrenal.

Tabela 1. Fatores inibidores da PRL

---

Dopamina
GABA
Somatostatina
Acetilcolina
Calcitonina
Neuropeptídeo Y (NPY)
Peptídeo atrial natriurético (PAN)
Neurotensina

---

Receptores dopaminérgicos D2 de alta afinidade estão presentes nas membranas dos lactotrofos. Após a ligação da dopamina com seu receptor, ocorre inibição da adenilciclase e diminuição da produção de AMP cíclico e da liberação da PRL (George *et al.*, 1985; Fischberg & Bancroft, 1995). A dopamina também age diretamente inibindo a síntese de PRL, via transcrição de RNA. A maioria das medicações que causam liberação de PRL age

bloqueando os receptores dopaminérgicos (haloperidol e fenotiazinas) ou depletando as reservas de dopamina nos neurônios túbero-infundibulares (reserpina, metildopa) (Ben-Jonathan *et al.*, 2001).

Tabela 2. Fatores liberadores da PRL

---

Hormônio estimulador da tireotrofina (TRH)
Hormônio estimulador de gonadotrofinas (GnRH)
Peptídeo intestinal vasoativo (VIP)
Opióides
Polipeptídeo ativador da adenilciclase hipofisária (PACAP)
Serotonina
Estrógenos
Peptídeo histidina-isoleucina
Peptídeo liberador de PRL (PrRP)
Angiotensina II
Ocitocina
Substância P
Galanina
Interleucinas
Histamina
Bombesina
Vasopressina (AVP)

---

A PRL regula sua própria liberação agindo no sistema hipotalâmico dopaminérgico por meio de retroalimentação negativa de alça curta, via estimulação dopaminérgica, contribuindo para a manutenção de sua homeostase (Cooper *et al.*, 1982; Devost & Boutin, 1999; Ben-Jonathan *et al.*, 2001; Wand, 2003). Ainda, a PRL é capaz de inibir sua secreção

agindo diretamente nos lactotrofos, ligando-se a receptores de membrana específicos (regulação parácrina) (Freeman *et al.*, 2000).

Fatores estimulatórios também regulam a secreção de PRL. Essas substâncias podem agir diretamente na hipófise ou indiretamente via bloqueio dopaminérgico. Estrógenos são importantes estimuladores fisiológicos da liberação de PRL, via estímulo direto nos lactotrofos. A exposição crônica dos lactotrofos ao estrógeno leva ao aumento do volume e do número celulares, e sua administração aguda aumenta a secreção de PRL dentro de horas. Estrógenos podem agir indiretamente alterando o tônus dopaminérgico ou aumentando a responsividade da PRL a outros neuromoduladores, causando uma elevação da PRL dose-dependente. Quantidades fisiológicas de estrógeno na mulher aumentam minimamente as concentrações de PRL, mas levam a uma maior resposta das mulheres a estímulos fisiológicos da secreção da PRL (Frantz, 1978). Experimentalmente, a exposição de ratos neonatos a estrógenos se associou com hiperprolactinemia sustentada e alteração da expressividade de receptores de estrógeno na hipófise e no hipotálamo (Khurana *et al.*, 2000). O mecanismo pelo qual o estrógeno interfere na secreção de prolactina envolve a ligação do complexo receptor de estrógeno-estrógeno com o elemento de resposta ao estrógeno no gene da prolactina nas células lactotróficas (Malayer & Gorski, 1995; Murdoch *et al.*, 1995). A observação de níveis mais elevados de PRL hipotalâmica em ratas, aliada à redução dos mesmos após hipofisectomia apenas em fêmeas (DeVito, 1988), levou o estrógeno a ser reconhecido como regulador da PRL hipotalâmica em animais. Aproximadamente um terço dos neurônios que contém PRL acumulam estradiol, indicando a presença de RE intracelulares (Shivers *et al.*, 1989). Recentemente, em estudos de cultura celular, demonstrou-se que o estrógeno estimula a secreção e a síntese de prolactina por

ativação da via MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*), interagindo com receptores de estrógeno e de IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*) (Arroba *et al.*, 2005).

Os fatores inibidores e estimuladores provenientes dos neurônios regulam os lactotrofos, conectado ao lobo anterior da hipófise pelos vasos portais curtos. Também podem ser provenientes de células vizinhas (regulação parácrina) ou dos próprios lactotrofos (regulação autócrina) (Freeman *et al.*, 2000).

### **3.1.4 Fisiologia da secreção da PRL**

A secreção da PRL é pulsátil, com aumento da concentração sérica associada com o sono. Ocorrem em média 4-14 pulsos por dia, 60% deles iniciados em 60 a 90 minutos após a indução do sono (Veldhuis & Johnson, 1988). Pulsos diurnos podem ser induzidos por refeições, estresse ou exercício. Com efeito, o conteúdo protéico da refeição parece ser o principal estimulador da secreção de PRL (Carlson *et al.*, 1989).

Antes da puberdade, a concentração sérica de PRL é similar em homens e mulheres. Após o início da puberdade, ocorre um aumento dos níveis de PRL em resposta à secreção estrogênica (Wand, 2003). A amplitude dos pulsos de PRL é significativamente maior em mulheres pré-menopáusicas que em homens e mulheres pós-menopáusicas, refletindo papel do estrógeno endógeno nessa diferença (Katznelson *et al.*, 1998).

### **3.1.5 Ações da PRL**

A PRL é uma molécula versátil, acumulando mais de 100 funções endócrinas e autócrinas descritas na literatura, incluindo iniciação e manutenção da lactação, desenvolvimento da glândula mamária (Kelly *et al.*, 2002), imunomodulação, osmorregulação e alterações de comportamento parental e reprodutivo (Ben-Jonathan &

Hnasko, 2001; Ben-Jonathan *et al.*, 2002; Yu-Lee, 2002). Ela é o hormônio luteotrófico primário durante a gravidez e desempenha papel fundamental na manutenção da lactação. Para tanto, receptores de PRL estão presentes no sistema endócrino (hipófise, supra-renal, ovário e testículo), SNC, pele (Ben-Jonathan *et al.*, 1996), mama, útero, próstata, glândulas lacrimais e submandibulares (Ben-Jonathan *et al.*, 2002; Yu-Lee, 2002), linfócitos B e T (Gutiérrez *et al.*, 1995), e trato gastrointestinal (Garcia-Caballero *et al.*, 1996).

Evidências atuais demonstram que a PRL tem implicações em mecanismos patológicos de diversos órgãos e tipos celulares, como na regulação da proliferação de diferentes tipos celulares, incluindo epitélio mamário, células beta-pancreáticas, astrócitos, células da hipófise anterior, adipócitos e linfócitos T (Schrell *et al.*, 1990; Yu-Lee, 2002; Goffin *et al.*, 2005).

A PRL altera as atividades secretórias, mitogênicas e morfogênicas celulares. Como citado na introdução, a diversidade das ações da PRL reflete seu polimorfismo estrutural, produção e processamento locais, isoformas de receptor e diferentes genes-alvo e vias de sinalização intracelular (Ben-Jonathan *et al.*, 2002).

#### PRL e proliferação celular

Nas últimas três décadas, estudos têm sugerido associação da PRL com proliferação tumoral (Ben-Jonathan *et al.*, 2002). Com efeito, evidências sugerem que a PRL pode agir como fator anti-apoptótico ou mitogênico. Sabe-se que a PRL prolonga a sobrevivência das células lóbulo-alveolares na glândula mamária de lactantes, inibindo sua apoptose (Ben-Jonathan *et al.*, 2002), e estimula a proliferação celular de diversos tecidos aumentando a probabilidade de abertura de canais de potássio, e sua consequente ativação, de forma ATP-dependente (Coppenolle *et al.*, 2004). Ainda, diversos estudos *in vitro* com várias linhagens



celulares de tumores mamários epiteliais comprovaram a atividade proliferativa da PRL (Vonderhaar, 1999; Llovera *et al.*, 2000). Recentemente, evidenciou-se o estímulo mitogênico da PRL no aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 nas células gliais e de câncer de mama (Ben-Jonathan *et al.*, 2002). Também se observou ação mitogênica da PRL em culturas de linfócitos T normais (Viselli *et al.*, 1991) e em células de linfoma Nb2 (Shiu *et al.*, 1983), na síntese de proteoglicanos e na modulação da diferenciação celular de condrócitos a partir de células mesenquimais pluripotenciais derivadas da medula óssea (Ogueta *et al.*, 2002).

Em estudos em animais, a hiperprolactinemia se correlacionou positivamente com o aumento da tumorigênese mamária (Nandi *et al.*, 1995; Wennbo *et al.*, 1997; Vonderhaar, 1999) e prostática (Costello & Franklin, 2002). Em seres humanos, a positividade de R-PRL também foi demonstrada em tecidos de câncer de mama (Bonnetterre *et al.*, 1982; Vonderhaar *et al.*, 1999), próstata (Peirce & Chen, 2001) e tumores de cólon e reto (Bhatavdekar *et al.*, 1994). Ainda, detectou-se a expressão em maior concentração de R-PRL em 80-90% dos tecidos de carcinoma mamário (Zinger *et al.*, 2003), correlacionando-se de forma linear com a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona (Ormandy *et al.*, 1997). Bhatavdekar e colaboradores demonstraram ocorrência de hiperprolactinemia (PRL >20ng/mL) em 58% das pacientes com câncer de mama, correlacionando-se significativamente com tamanho tumoral, estágio avançado da doença e comprometimento linfonodal metastático (Bhatavdekar *et al.*, 2000). Desse mesmo modo, a hiperprolactinemia (PRL > 20ng/mL) esteve associada a um prognóstico mais sombrio em pacientes com câncer de cólon e reto (Bhatavdekar *et al.*, 1995). Entretanto, o uso de bromocriptina para a normalização da PRL sérica não demonstrou benefício na sobrevida

de pacientes com câncer de mama (Bonnetterre *et al.*, 1988) e de próstata (Horti *et al.*, 1998).

Em suma, apesar da literatura sugerir que os níveis de PRL possam influenciar na carcinogênese, não há, até o momento, uma correlação clara entre hiperprolactinemia e etiologia ou prognóstico de câncer em seres humanos (Vonderhaar, 1999; Colao *et al.*, 2004; Goffin *et al.*, 2005).

### **3.1.6 Epidemiologia da hiperprolactinemia**

Por definição, hiperprolactinemia corresponde a qualquer aumento dos níveis de PRL acima dos valores de referência do método empregado. Os valores normais de referência para prolactina sérica variam, geralmente, de 3 a 28ng/mL em mulheres e de 3-17ng/mL em homens (Verhelst & Abs, 2003).

Hiperprolactinemia é um distúrbio endócrino comum, ocorrendo em 15-20% das mulheres com irregularidade menstrual (Greer *et al.*, 1980), em 20% das mulheres com amenorréia secundária (Katznelson & Klibanski, 2001), em 43-87% das mulheres com galactorréia e amenorréia (Wand, 2003) e em 30-40% das mulheres inférteis (Prathibha *et al.*, 1994). Apenas 1 a 2% dos homens com disfunção erétil e/ou diminuição da libido apresentam hiperprolactinemia (Akpunonu *et al.*, 1994).

### **3.1.7 Causas fisiológicas de hiperprolactinemia**

A Tabela 3 apresenta as causas fisiológicas de hiperprolactinemia.

A PRL aumenta em resposta ao estresse, incluindo exercícios físicos (Dohi *et al.*, 2003), cirurgias, relações sexuais, hipoglicemia e crises convulsivas (Wand, 2003). Todavia, esse aumento é geralmente pequeno, com valores não ultrapassando 40ng/mL.

Os níveis de PRL em mulheres em idade fértil são ligeiramente maiores que em homens, provavelmente devido à ação estrogênica direta. Observa-se um declínio progressivo nos níveis de PRL em mulheres com a idade, principalmente após a menopausa, bem como da responsividade da PRL a estímulos farmacológicos (TRH) (Nunley *et al.*, 1991).

Tabela 3. Causas fisiológicas de hiperprolactinemia

---

Gravidez

Lactação

Neonatal

Terapia estrogênica

Sono

Estresse

Hipoglicemia

Relação sexual

Estimulação mamilar

Exercício físico

Refeição

Dor

---

A prolactina aumenta fisiologicamente durante a gestação, atingindo um pico no final da gestação em torno de 200ng/mL (variando de 25-600ng/mL) (Tyson *et al.*, 1972; Nunley *et al.*, 1991), sendo o estrógeno o principal responsável.

A lactação se inicia no período pós-parto, após a queda abrupta dos níveis estrogênicos. Durante as primeiras 4-6 semanas de puerpério, os níveis de PRL aumentam em 10-60 vezes o valor basal 30 a 60 minutos após cada mamada, sendo esse pico associado com aumento da amplitude dos pulsos (Diaz *et al.*, 1989; Verhelst & Abs, 2003). Com a continuidade da amamentação a estimulação mamilar exerce progressivamente menor efeito na secreção da prolactina, e, dentro de 4-6 meses após o parto, os níveis de PRL normalizam (Nunley *et al.*, 1991; Verhelst & Abs, 2003).

### **3.1.8 Causas patológicas de hiperprolactinemia**

As causas patológicas de hiperprolactinemia estão na Tabela 4, sendo a mais comum os adenomas hipofisários secretores de PRL (Wand, 2003), denominados prolactinomas. Elevações substanciais da PRL (>150ng/mL) em estado não gravídico-puerperal geralmente indicam um tumor hipofisário. Prolactinomas são relativamente comuns, correspondendo a 30-40% dos tumores hipofisários (Molitch, 2001). Eles são classificados, assim como os demais adenomas hipofisários, de acordo com o tamanho tumoral em microprolactinomas (<10mm de diâmetro) e macroprolactinomas (> ou = 10mm de diâmetro). Macroprolactinomas representam 1/3 de todos os prolactinomas em mulheres e mais de 2/3 dos prolactinomas em homens (Delgrange *et al.*, 1997). Com efeito, a secreção de PRL é geralmente caracterizada pela sua eficiência e proporcionalidade entre a população de lactotrofos e os níveis de PRL sérica. Assim, mesmo pequenos adenomas

são capazes de causar hiperprolactinemia, e há uma boa correlação entre o tamanho tumoral nos exames de neuroimagem e os níveis de PRL sérica, sendo grandes tumores associados a altos níveis de PRL. Os prolactinomas derivam da expansão monoclonal de uma única célula que sofreu mutação somática (Herman *et al.*, 1990). Em sua maioria, observa-se hiperexpressão do gene transformador de tumor hipofisário – PTTG1 (Zhang *et al.*, 1999; Horwitz *et al.*, 2003). Em aproximadamente 10% dos casos os adenomas são co-secretores de hormônio de crescimento (Molitch, 2001).

Tabela 4. Causas patológicas de hiperprolactinemia

Doença Hipofisária	Estimulação Periférica
Tumores secretores de PRL	Trauma de parede torácica
Acromegalia	Lesão de parede torácica
Doença de Cushing	Herpes zoster
Síndrome da Sela Vazia	Estimulação mamilar
Secção/ Compressão da Haste Hipofisária	Medicações
Tumores hipofisários	Fenotiazinas, cocaína, cimetidina
Trauma	Antidepressivos tricíclicos
	Cocaína, metoclopramida
Doenças Hipotalâmicas Infiltrativas	Metildopa, reserpina, verapamil
Craniofaringiomas	
Meningiomas	Outras
Germinomas, linfomas	Insuficiência renal
Tuberculose	Insuficiência hepática
Sarcoidose	Insuficiência adrenal
Irradiação	Produção hormonal ectópica
Granuloma eosinofílico	Crises convulsivas
Tumores metastáticos	Síndrome dos ovários policísticos
	Hipotireoidismo primário

Elevações modestas da PRL (25-100ng/mL) podem estar associadas a diversas causas. Inúmeras condições levam à diminuição da inibição dopaminérgica da secreção de PRL, como dano aos neurônios dopaminérgicos hipotalâmicos (tumores e doenças

infiltrativas), secção ou compressão da haste hipofisária (trauma crânio-encefálico e tumores hipofisários), drogas que bloqueiam os rece

dopamina hipotalâmica à hipófise anterior via circulação portal hipofisária (Verhelst & Abs, 2003).

Como descrito anteriormente, o TRH estimula a síntese e secreção de PRL dos lactotrofos normais e neoplásicos. O hipotireoidismo primário leva a aumento da secreção de TRH e da resposta da PRL ao TRH, podendo acarretar hiperprolactinemia. Geralmente os valores de PRL são inferiores a 100 ng/mL e retornam ao normal com a compensação do hipotireoidismo (Grubb *et al.*, 1987; Wand, 2003).

A insuficiência renal crônica (IRC) leva a um aumento da secreção na ordem de 3 vezes e a uma diminuição do clearance (em 30%) da PRL. Como resultado, pacientes com IRC apresentam níveis elevados de PRL, que geralmente se normalizam após transplante renal (Sievertsen *et al.*, 1980).

Hiperprolactinemia também pode ser observada em pacientes com insuficiência hepática (Wernze & Schmitz, 1997), síndrome de ovários policísticos (Isik *et al.*, 1997), lesões ou trauma de parede torácica (Wand, 2003), crises convulsivas (Willert *et al.*, 2004) síndrome paraneoplásica de carcinoma renal e pulmonar (Ozarda, 1983).

Em um número substancial de pacientes com PRL sérica entre 20-100ng/mL, nenhuma causa é encontrada, sendo esta condição denominada “hiperprolactinemia idiopática”. Esta geralmente corresponde a 10-20% das hiperprolactinemias, excluindo o uso de drogas (Verhelst & Abs, 2003), conforme listagem na Tabela 5. Muitos desses pacientes podem ter microadenomas não visíveis em estudos de imagem, e, na maioria, os níveis de PRL permanecem estáveis por vários anos (Martin *et al.*, 1989; Sluijmer & Lappöhn, 1992).

Tabela 5. Drogas associadas à hiperprolactinemia

---

Verapamil

Antagonistas dos receptores histamínicos H2 (cimetidina)

Estrógenos

Hormônio estimulador da tireotrofina (TRH)

Opióides

Antagonistas dos Receptores Dopaminérgicos

Fenotiazinas, haloperidol, risperidona, metoclopramida, sulpirida, domperidona

Inibidores das catecolaminas

Reserpina, metildopa

Outros \*

Antidepressivos tricíclicos

Inibidores da recaptação de serotonina (fluoxetina e paroxetina)

Inibidores da enzima conversora de angiotensina

---

\* geralmente associados à hiperprolactinemia clinicamente não significativa

Aproximadamente 10-26% dos pacientes com hiperprolactinemia apresentam uma condição chamada de “macroprolactinemia” (Fahie-Wilson & Soule, 1997; Smith & McKenna, 1999). São pacientes geralmente assintomáticos que apresentam exame de imagem hipofisária normal. Macroprolactinemia, ou pseudo-hiperprolactinemia, tem caráter benigno, ocorrendo quando a isoforma *Big-big* da PRL, de alto peso molecular, corresponde à maior parte da prolactina circulante. Ela pode ser distinguida da hiperprolactinemia de outras causas utilizando-se o exame de filtração em gel ou



precipitação em polietilenoglicol (PEG) (Olukoga & Kane, 1999; Leslie *et al.*, 2001; Vallete-Kasic *et al.*, 2002; Suliman *et al.*, 2003). Convencionalmente, o diagnóstico da macroprolactinemia é baseado no achado de mais de 30-60% de macroprolactina na cromatografia por filtro em gel ou uma recuperação menor que 30-40% após precipitação do soro em polietilenoglicol (Olukoga & Kane, 1999).

### **3.1.9 Manifestações clínicas da hiperprolactinemia**

A síndrome galacto-amenorréica é a descrição clássica das manifestações clínicas da hiperprolactinemia.

Em mulheres, infertilidade, distúrbios menstruais (oligo-amenorréia), galactorréia e diminuição da libido refletem o hipogonadismo hiperprolactinêmico. O mecanismo desse hipogonadismo hipogonadotrófico envolve a inibição da secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH), via inibição direta da liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Gomez *et al.*, 1977). Os sintomas de hiperprolactinemia em mulheres pré-menopáusicas se correlacionam com os níveis de prolactina, sendo hipogonadismo completo tipicamente associado a elevações superiores a 100ng/mL. Graus moderados de hiperprolactinemia (50-100ng/mL) podem levar à amenorréia ou oligomenorréia. Graus mais leves (20-40ng/dl) podem causar apenas produção insuficiente de progesterona com encurtamento da fase lútea do ciclo menstrual (Corenblum, 1976). Mesmo na ausência de alteração do ciclo menstrual pode-se observar infertilidade associada à hiperprolactinemia.

Nas mulheres pós-menopáusicas, o único sinal de hiperprolactinemia pode ser o desaparecimento dos fogachos devido à supressão da secreção de LH e FSH. Nessas

pacientes o hipogonadismo já está presente e raramente se observa galactorrêia devido ao hipoestrogenismo (Verhelst & Abs, 2003).

Em homens, o hipogonadismo hipogonadotrófico associado à hiperprolactinemia se caracteriza por diminuição da libido, impotência e infertilidade. Ginecomastia e galactorrêia são menos freqüentemente observados devido aos baixos níveis de estrógenos circulantes (Walsh & Pullan, 1997).

Osteopenia e osteoporose podem ser observadas em pacientes com hiperprolactinemia crônica. Estudos demonstraram que a densidade mineral óssea é 20-25% menor em mulheres com hiperprolactinemia, quando comparadas a controles pareados para a idade (Schlechte *et al.*, 1987; Biller *et al.*, 1992), e correlaciona-se positivamente

tratamento deve ser voltado para a doença de base. Em caso de aumento de prolactina associada ao uso de medicamentos, deve-se individualizar cada caso antes de optar por suspender e/ou trocar a medicação por outra que sabidamente não interfira com o eixo lactotrófico. Em prolactinomas, bem como em hiperprolactinemia idiopática sintomática os agonistas dopaminérgicos são considerados tratamento de primeira linha, sendo a bromocriptina, a quinagolida e a cabergolina os principais representantes dessa classe. Níveis normais de prolactina são atingidos em 83% e 59% das pacientes tratadas com cabergolina e bromocriptina, respectivamente. Além da normoprolactinemia, sabe-se que os agonistas dopaminérgicos também levam à redução tumoral em grande parte dos pacientes tratados (Cook, 2005).

## **3.2. Receptor de PRL (R-PRL)**

### **3.2.1 Generalidades**

Em 1988, os R-PRLs foram seqüenciados e clonados, sendo reconhecidos como proteínas transmembrana de cadeia única, compostos de um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular (Boutin *et al.*, 1988). Juntamente com os receptores do hormônio do crescimento, os R-PRL fazem parte da superfamília de receptores da citocina, compartilhando inúmeras características estruturais e funcionais, apesar da baixa homologia da seqüência (Freeman *et al.*, 2000).

As ações da PRL são mediadas pela ligação com receptores de membrana celular, formando o complexo hormônio-receptor. A relação da PRL com seu receptor é

representada por uma curva em U invertido, e não uma resposta linear progressiva. Desse modo, em altas doses, a ligação da PRL com o R-PRL tende a ser menos efetiva do que em níveis normais (Ben-Jonathan *et al.*, 2002).

### **3.2.2 Gene responsável pelo R-PRL**

O gene que codifica o R-PRL está localizado no cromossomo 5 e contém, ao menos, dez exons. A regulação transcricional do gene do R-PRL é realizada por três diferentes regiões promotoras específicas para cada tecido. O promotor 1 é específico para o tecido gonadal, o promotor 2 para fígado, e o promotor 3 é genérico, estando presente em tecido gonadal e extra-gonadal (Hu *et al.*, 1996). Diversas isoformas do R-PRL são descritas em vários tecidos, resultando da transcrição mediada por diferentes sítios de iniciação desses três promotores dos R-PRL (Freeman *et al.*, 2000).

### **3.2.3 Descrição do R-PRL e de suas isoformas**

Como descrito previamente, os R-PRL são proteínas transmembrana de cadeia única, compostos de um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular. Diversas isoformas do R-PRL são descritas em diferentes tecidos (Freeman *et al.*, 2000), variando no tamanho e composição dos domínios citoplasmáticos, mas com domínios extracelulares idênticos (Kelly *et al.*, 1991; Goffin & Kelly, 1996). O domínio extracelular das isoformas do R-PRL consiste em 210 aminoácidos e apresenta semelhança seqüencial com outros receptores de citocina. Este se divide em um subdomínio terminal NH<sub>2</sub> - D1 e um subdomínio de membrana proximal - D2, ambos com homologia à

molécula da fibronectina tipo III, responsável pela interação receptor-ligante da maioria dos receptores de citocina (Goffin & Kelly, 1996; Freeman *et al.*, 2000).

### 3.2.4 Mecanismo de ação e sinalização do R-PRL

Cada molécula de PRL contém dois sítios de ligação. O sítio 1 envolve as hélices 1 e 4, e o sítio 2, as hélices 1 e 3. Primeiramente, o sítio 1 da molécula de PRL interage com o R-PRL. A formação desse complexo receptor-PRL inicial é pré-requisito para a interação do sítio 2 da mesma molécula de PRL com um segundo R-PRL. Desse modo, a ativação do R-PRL só pode ser iniciada quando o complexo trimérico (2 receptores + 1 hormônio/PRL) é formado (Freeman *et al.*, 2000), desencadeando seus efeitos moleculares com ativação de cinases e sinalizando seqüências (Figura 1).

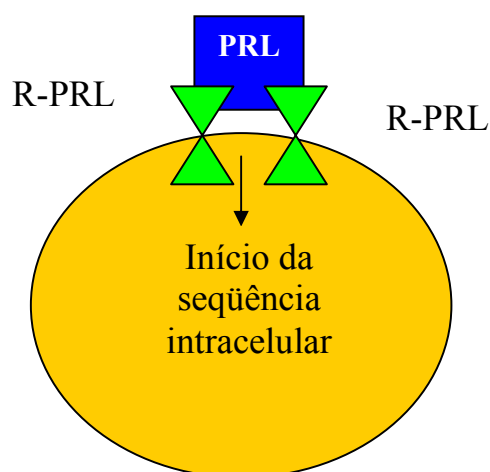


Figura 1. Formação do trímero para início da seqüência intracelular  
PRL: prolactina; R-PRL: receptor de prolactina

Os domínios intracelulares das isoformas dos R-PRL apresentam composição e tamanhos diferentes e guardam pouca similaridade com os outros receptores de citocinas.

Todavia, existem duas regiões relativamente conservadas, denominadas *Box-1* e *Box-2*. *Box-1* é proximal, enriquecida com prolina e essencial para o reconhecimento das moléculas transdutoras (Freeman *et al.*, 2000).

O domínio intracelular do R-PRL é desprovido de atividade tirosina quinase intrínseca (Goffin & Kelly, 1996). A estimulação hormonal leva à fosforilação de diversas proteínas celulares, incluindo os próprios receptores, utilizando a via *Jak-Stat* como cascata de sinalização principal. Proteína integrante da família *Janus* tirosina quinase, a *Janus* quinase 2 (Jak2), é rapidamente fosforilada com a dimerização do receptor e induz a fosforilação do receptor e das proteínas *Stat* (*signal transducers and activators of transcription*). Dois pré-requisitos são necessários para a ativação da via Jak-2: a presença do *Box-1* enriquecido com prolina no domínio intracelular do R-PRL, e a estequiometria homodimérica da dimerização do R-PRL induzida pelo ligante (Freeman *et al.*, 2000). A ativação da *Jak-2* ocorre, então, por transfosforilação através da dimerização do R-PRL. Ela induz à fosforilação dos resíduos de tirosinas do próprio R-PRL. Apesar da fosforilação da *Jak-2* ocorrer em todas as isoformas ativas de R-PRL, a fosforilação da tirosina do próprio receptor não ocorre com a ativação da forma curta do R-PRL, responsável por funções na proliferação celular (Goupille *et al.*, 1997; Goupille *et al.*, 2000).

As proteínas *Stat* integram a família de fatores de transcrição citoplasmáticos latentes, sendo consideradas um dos principais transdutores da sinalização dos receptores de citocinas. São oito membros da família *Stat*, dos quais quatro, *Stat* 1, 3, 5a e 5b, são ativados pelo R-PRL. Consideram-se *Stat* 5a e 5b como os principais mediadores. As proteínas *Stat* são constituídas por 5 elementos: um domínio de ligação com DNA, um domínio SH3-like, um domínio SH2-like, um domínio terminal de transativação NH2 e COOH (Finidory & Kelly, 1995). O resíduo de tirosina fosforilada do receptor de citocina

ativado interage com o domínio SH2 das *Stat*. Desse modo, a *Stat* é fosforilada pela *jak-quinase* associada ao receptor (Bole-Feysot *et al.*, 1998). As proteínas *Stat* ativadas sofrem dimerização e se translocam para o núcleo da célula ligando-se a seqüências específicas do DNA de genes-alvo (Goffin & Kelly, 1996; Ben-Jonathan *et al.*, 2002).

Outras seqüências quinases são ativadas paralelamente pela PRL, como *Fyn*, *Src*, *Ras*, *Raf*, serina/treonina quinases, *Akt*, proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) e proteína quinase C (Freeman *et al.*, 2000; Goupille *et al.*, 2000; Yu-Lee, 2002). A coordenação entre essas seqüências paralelas secundárias determina a ocorrência de diferentes padrões de expressão de genes-alvo, e o pleiotropismo das ações da PRL na proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose celulares.

### **3.2.5 Distribuição tecidual dos R-PRL**

Receptores de PRL estão presentes em praticamente todos os tecidos, incluindo sistema endócrino (hipófise, supra-renal, ovário e testículo), sistema nervoso central, músculo esquelético, pele (Ben-Jonathan *et al.*, 1996), mama, endométrio (Jones *et al.*, 1998), próstata, glândulas lacrimais e submandibulares, coração, timo, baço (Ben-Jonathan *et al.*, 2002; Yu-Lee, 2002), linfócitos B e T (Gutiérrez *et al.*, 1995), condrócitos (Ogueta *et al.*, 2002) e trato gastrointestinal (Garcia-Caballero *et al.*, 1996). Os locais de maior densidade de R-PRL são fígado, plexo coróide, ovário e mama (Freeman *et al.*, 2000; Ben-Jonathan *et al.*, 2001).

### 2.2.6 Detecção do R-PRL

Desde 1988, quando foram seqüenciados e clonados os R-PRLs (Boutin *et al.*, 1988), inúmeros trabalhos foram desenvolvidos avaliando a sua expressão nos mais diferentes tecidos. As técnicas mais comumente utilizadas para tal são imunistoquímica (II) e reação em cadeia da polimerase (PCR).

O estudo imunistoquímico se baseia na utilização de anticorpos mono ou policlonais específicos para determinados epítomos de um determinado receptor, no caso, o R-PRL. Ele apresenta a vantagem de poder ser aplicado mesmo em amostras teciduais com pequena quantidade de células. Com efeito, a II permite avaliar a presença e a percentagem de células imunorreativas, bem como a intensidade de coloração dessas células individualmente.

Outro método também utilizado é a quantificação do RNA mensageiro (RNAm) do R-PRL através de PCR em tempo real (Chiu *et al.*, 1992; Carroll *et al.*, 1996; Castillo *et al.*, 2004). Bhatavdekar e colaboradores, em 2000, sugeriram uma classificação em cruzes conforme a percentagem de células positivas, variando de negativo (nenhuma célula positiva), 1+ (< de 5% das células positivas), 2+ (5-50% das células positivas) e 3+ (>50% das células positivas). Entretanto, em relação ao R-PRL, não há consenso na literatura atual sobre sua quantificação ou sobre os valores limites mais adequados para avaliação da sua positividade nas diferentes técnicas, sendo a presença de uma célula corada já considerada positiva (Bhatavdekar *et al.*, 2000; Peirce & Chen, 2001).



### **3.3 Marcador de Replicação Celular: MIB-1**

Considerando-se a proliferação celular, acredita-se que quanto maior a atividade proliferativa de um tumor, pior será seu comportamento biológico. Como consequência, muito esforço tem sido feito no desenvolvimento de métodos objetivos para avaliar a proliferação celular e o significado destes métodos, mais do que a atividade proliferativa

se preparando para o início da síntese de DNA e caracterizado por pronunciada síntese de RNA; fase S, na qual há a síntese de DNA propriamente dita e fase G<sub>2</sub>, entre o final da fase S e o início da mitose, quando a célula apresenta conteúdo duplicado de material genético. Ainda temos as células na fase G<sub>0</sub>, dita quiescente, usualmente encarregadas de executar a função do tecido em questão e que estão fora do ciclo celular propriamente dito. O ciclo celular está representado na figura 2.

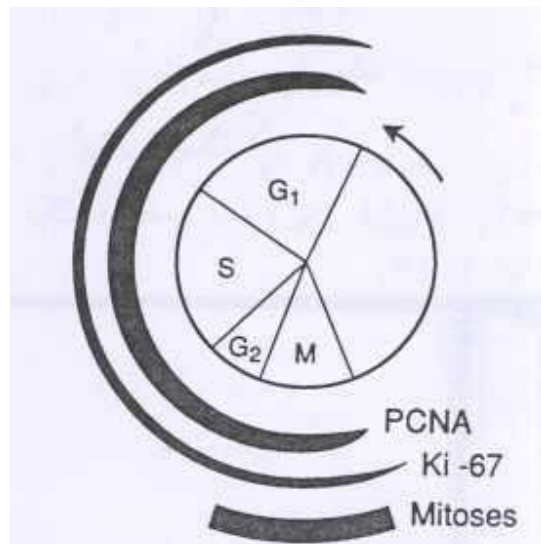


Figura 2: Representação esquemática do ciclo celular, do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e do Ki-67. Adaptado de Murray e colaboradores, 1994.

Durante o ciclo celular, as células têm três rotas possíveis a percorrer: permanecer no ciclo e, portanto, seguir para a próxima divisão; permanecer viva sem divisões adicionais, usualmente entrando em G<sub>0</sub> ou sofrendo diferenciação, ou morrer por apoptose. As decisões sobre que rota seguir acontecem em dois pontos cardinais: o ponto no qual há



### Marcação pela timidina triciada (T[H<sub>3</sub>])

É um método clássico de avaliação da proliferação celular, no qual um análogo radioativo da timidina é fornecido para uma cultura de células ou inoculado em animal vivo, sendo incorporado pelas células em fase S e posteriormente visibilizado através de autorradiografia (Quinn & Whright, 1990). O total de células que incorpora a T[H<sub>3</sub>] reflete a fração de fase S daquela população celular. Apesar de ser um método bastante interessante, tem a desvantagem de ser usado somente em células vivas. Tanto a T[H<sub>3</sub>] quanto a bromodeoxiuridina são usados como parâmetro de comparação na avaliação dos métodos II por serem métodos muito bem estabelecidos.

### Marcação pela prata das regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR)

As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) são alças de DNA que transcrevem o RNA ribossomal. As NORs podem ser demonstradas através do método de impregnação pela prata (Ag), devido à argirofilia das proteínas a ela associadas. Este método mede o grau de dispersão das NORs, que reflete a atividade proliferativa de uma população celular e a velocidade com que as células percorrem o ciclo celular. O uso da AgNOR tem um valor adicional, podendo ser associado aos demais métodos que avaliam a fração de crescimento, para se ter uma visão mais precisa da atividade proliferativa do tumor (Brugal, 1995).

### Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica automatizada que permite a quantificação do conteúdo de DNA celular e a análise da distribuição das células dentro do ciclo celular. De acordo com o conteúdo de DNA, conhecido como ploidia, pode-se determinar as células

que estão em fase G0/G1 (diploides), células em fase G2 (tetraploides) e células em S (conteúdo intermediário de DNA). A principal vantagem está na enorme quantidade de células que podem ser avaliadas em um curto espaço de tempo e a principal desvantagem está na impossibilidade de correlação direta com a morfologia das mesmas, tornando difícil a separação dos dados provenientes de células tumorais das outras células do tecido (fibroblastos, linfócitos, etc.). Sistemas mais modernos, incluindo análise de múltiplos marcadores e o uso de filtros segundo características morfológicas das células, aumentam consideravelmente o potencial deste método (De Mello & Alves, 1999).

### **3.3.3 Detecção da replicação celular: métodos imunoistoquímicos**

Os métodos II baseiam-se na detecção de antígenos, cuja expressão tenha relação quantitativa ou qualitativa com uma ou mais fases do ciclo celular. Kreipe e colaboradores, em 1995, propõem o agrupamento destes antígenos em duas categorias: enzimas e cofatores envolvidos na síntese de DNA durante a fase S do ciclo celular, nos quais enquadra-se o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), mas também outros, como a DNA polimerase alfa e a topoisomerase II alfa, e proteínas de função desconhecida, com destaque para o Ki-67.

#### **Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)**

Historicamente, foi descrito como um auto-anticorpo, presente em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, que identificava um antígeno presente nas células em proliferação (Miyachi *et al.*, 1978; Takasaki *et al.*, 1981). Este antígeno foi identificado como PCNA, uma proteína nuclear não histônica de 36 kD, envolvida na síntese do DNA

(Mathews *et al.*, 1984). O PCNA é necessário para a replicação do DNA *in vivo* e *in vitro* e, pelo menos *in vitro*, também é necessário no processo de reparo do DNA (Ghnassia, 1996). Tem sido empregado como marcador operacional de proliferação celular, de uma maneira mais ampla, com o desenvolvimento de anticorpos que funcionam em material fixado em formol e incluído em parafina (Wassen & Lane, 1990). No estudo de tumores, alguns autores têm encontrado uma boa correlação com outros parâmetros de medida da proliferação celular, como o próprio Ki-67 (Dervan *et al.*, 1992), enquanto outros, paradoxalmente, não (Visakorpi, 1992). O PCNA tem uma meia-vida muito longa, cerca de 20 horas, o que permite que células que há muito tempo deixaram o ciclo celular persistam apresentando o antígeno (Scott *et al.*, 1991), resultando em uma proporção de positividade imunohistoquímica maior do que a esperada quando são avaliados outros marcadores de proliferação celular. O PCNA aparece em todas as fases do ciclo celular e o que realmente varia é a sua quantidade ao longo do ciclo, o que dificulta muito a sua interpretação.

#### Antígeno nuclear Ki-67

Em 1983, Gerdes e colaboradores descreveram a preparação de um anticorpo monoclonal de camundongo, dirigido a um antígeno presente em células em proliferação que foi chamado de Ki-67 (Gerdes *et al.*, 1983). Este anticorpo foi denominado de Ki-67 por ter sido produzido em Kiel, na Alemanha e porque o clone produzido cresceu na sexagésima sétima placa de cultura. Foi obtido em estudos que tinham como objetivo a produção de anticorpos monoclonais para antígenos nucleares específicos das células de Hodgkin e Reed-Sternberg, através da imunização de camundongos com extrato nuclear da linhagem celular L428. Os produtos dos hibridomas, que reagem com núcleos das células neoplásicas do linfoma de Hodgkin, foram retestados em secções de tecido congelado de

linfonodo parcialmente envolvido pela doença de Hodgkin. O anticorpo designado Ki-67, além de reagir com núcleos de células de Hodgkin e Reed-Sternberg, também o fez com núcleos de células presentes em centros germinativos. Já a grande maioria das células linfóides, presentes fora dos centros germinativos e outras células, como plasmócitos, e fibroblastos eram negativas para o Ki-67. Como as células do centro germinativo são sabidamente células com alta taxa de proliferação, foi levantada a hipótese de que o antígeno identificado pelo Ki-67 estava relacionado à proliferação celular. Testou-se esta hipótese utilizando-se o Ki-67 em tecidos com padrão de proliferação conhecido. Os resultados foram altamente comparáveis com os obtidos em estudos de captação de timidina [ $H_3$ ] nos mesmos tecidos. A relação do Ki-67 com a proliferação celular estava evidenciada.

A relação entre o Ki-67 e a proliferação celular também foi demonstrada pela estimulação de culturas de células em repouso com fito-hemaglutinina (PHA), fazendo com que estas células se transformassem em células proliferativas e passassem a expressar Ki-67 em seus núcleos. Estes experimentos iniciais ainda não esclareciam se o Ki-67 estava presente em apenas algumas ou em todas as fases do ciclo celular, mas estudos posteriores demonstraram a expressão do Ki-67 nas diferentes fases do ciclo celular (Gerdes *et al.*, 1984).

Em 1988 e 1989, Verheijen e colaboradores publicaram suas observações sobre a localização do antígeno Ki-67, primeiramente no núcleo em interfase e depois no núcleo em mitose. No núcleo em interfase, o Ki-67 reage co

Além disso, o antígeno Ki-67 parece estar preservado na matriz nuclear de preparações obtidas depois do fracionamento *in situ* de células MR65 em interfase.

No núcleo em mitose, o nucléolo gradualmente se desintegra e acaba desaparecendo quando os cromossomas se condensam. Usando-se imunofluorescência com Ki-67, os seguintes padrões foram identificados nas diferentes fases da mitose: na prófase, o padrão nuclear do Ki-67 transforma-se em uma rede através do nucleoplasma, aparentemente associada à cromatina; na metáfase, foi observado um retículo de fibrilas fluorescentes interconectadas, alterando-se para um padrão mais granular durante a anáfase e telófase; durante a telófase tardia, o Ki-67 apresenta um padrão pontilhado, que segue-se por uma agregação destes pontos, restaurando finalmente o padrão nucleolar típico da interfase nas células filhas.

A caracterização biológica do antígeno Ki-67 começou a tomar consistência com uma nova publicação de Gerdes e colaboradores em 1991. Além de confirmar que o antígeno tratava-se de uma proteína não histônica, foi demonstrada sua alta sensibilidade ao tratamento com proteases. Usando métodos de tipo *immunoblot*, nos quais o tempo de preparação dos lisados era encurtado para minimizar o problema da suscetibilidade à proteólise, estes autores obtiveram sucesso em caracterizar o antígeno Ki-67 como um complexo bimolecular com peso molecular de 345 e 395 kD. O gene que codifica o antígeno Ki-67 também foi clonado e seqüenciado, localizando-se no cromossoma 10 (10q25) (Schonk *et al.*, 1989).

Em 1992, publicou-se o avanço que foi provavelmente o mais importante em tornar a determinação do Ki-67 a principal arma de avaliação da proliferação celular em neoplasias. Foi descrita a produção de dois novos anticorpos (MIB-1 e MIB-3), capazes de detectar a expressão da proteína Ki-67 em material incluído em parafina (Cattoretti *et al.*,



1992; Gerdes *et al.*, 1992). Quando foi utilizado o método de recuperação de epítomos no forno de microondas, o padrão de reação do MIB-1 e MIB-3 tornou-se similar ao que se obtinha com o anticorpo Ki-67 em material congelado. Isto tornava possível a avaliação da fração de crescimento em material de arquivo, mesmo em blocos de parafina estocados por muitos anos.

Uma vantagem adicional do Ki-67 como marcador de células em proliferação é a sua meia-vida curta, com o antígeno sendo degradado uma hora ou menos após a mitose (Bruno & Dazynkiewicz, 1992). Isto garante que células que já tenham saído do ciclo celular não apresentem o antígeno. O fato das células em fase G1 precoce, que acabam de sair de G0, não apresentarem o antígeno faz com que freqüentemente se argumente que a marcação do Ki-67 levaria a alguma subestimação da fração de crescimento de um tecido; outros, no entanto, têm demonstrado justamente o contrário (Scott *et al.*, 1991).

De qualquer forma, tendo em vista todos estes dados, parece-nos claro que a marcação do Ki-67 resulta numa avaliação bastante aproximada da fração de crescimento de uma população celular. A marcação, mesmo que tênue, pode ser considerada positiva, ou seja, a célula, mesmo minimamente marcada encontra-se dentro do ciclo celular. Em adição, tem-se disponível um anticorpo monoclonal, o MIB-1, que apresenta resultados homogêneos e de fácil interpretação em material parafinado. Desse modo, acredita-se que o Ki-67, na forma do MIB-1, é o melhor marcador operacional da proliferação celular, o que é corroborado pelo crescente número de trabalhos na literatura (Bruno & Dazynkiewicz, 1992; Cattoretti *et al.*, 1992; Gerdes *et al.*, 1992; McCormicke *et al.*, 1993; Schwarting, 1993; De Mello & Alves, 1999).

O Ki-67 é um marcador nuclear, portanto, apenas a positividade nuclear, mesmo que tênue, deve ser considerada. Em relação ao Ki-67/MIB-1, têm-se observado constância

dos resultados, mesmo quando tempos tão longos quanto 10 dias de fixação em formalina são aplicados (De Mello & Alves, 1999). Em relação ao retardo no início da fixação, não se tem dados na literatura a este respeito. Um outro aspecto importante e que favorece o uso do Ki-67/MIB-1 é a influência da diluição dos anticorpos nos resultados da marcação II. Com o Ki-67/MIB-1, grandes variações na diluição produzem resultados similares (McCormick *et al.*, 1993).

O aspecto metodológico da avaliação destes marcadores também é muito importante. A forma como ele é avaliado nas publicações científicas é bastante variada, mas usualmente predominam os métodos quantitativos, nos quais os núcleos são contados visualmente ou através de sistemas computadorizados de análise de imagens. Estudos comparativos recentes entre os métodos de contagem e método de estimativa (semi-quantificação) para o Ki-67/MIB-1 obtiveram resultados similares, levando a crer que a semi-quantificação, por dar resultados semelhantes à contagem e por consumir menor tempo, é suficiente para fins práticos (De Mello & Alves, 1999).

O ponto de corte a partir do qual um tumor é considerado altamente proliferativo também é muito variável. No caso do carcinoma de mama, usualmente, quando o tumor tem menos do que 10% dos núcleos marcados para Ki-67/MIB-1, é considerado como tendo um baixo índice de proliferação, sendo mais do que 25% um alto índice. Valores entre 10-25% poderiam ser considerados moderados.

A atividade proliferativa de um tumor é o resultado de sua fração de crescimento e também da velocidade com que o tumor completa o ciclo celular (tempo de geração). O Ki-67 marca de forma muito aproximada a fração de crescimento de uma população de células. A avaliação da fração de crescimento através da marcação imunoistoquímica do Ki-67 parece ser o método mais promissor para uso em patologia, devido à relação biológica bem

definida desta proteína com o ciclo celular, à facilidade com que o método pode ser aplicado e à confiabilidade dos resultados em um laboratório II bem estabelecido (Schwartz, 1993).

### **3.4 Tumores primários do SNC**

#### **3.4.1 Conceito e epidemiologia**

Tumores primários do SNC são neoplasias originadas de diferentes tipos celulares do SNC, incluindo parênquima cerebral, meninges, nervos cranianos, hipófise e pineal. Apesar de serem considerados raros, sua incidência vem aumentando nos últimos 50 anos. Desde 1970, a incidência de tumores cerebrais primários aumentou em sete vezes na população acima de 70 anos de idade (Flowers, 2000). Especula-se que este aumento esteja associado, em parte, à maior sobrevivência da população idosa e à melhor qualidade dos exames de imagem (Polednak, 1996).

A prevalência geral de tumores no SNC varia de 10 a 17 por 100.000 pessoas para tumores intracraniais e 1 a 2 por 100.000 pessoas para os espinais (Girolami *et al.*, 1999). Neoplasias secundárias metastáticas (pulmão, cólon, melanoma, etc) correspondem a aproximadamente 50% de todos os tumores do SNC.

A incidência estimada de tumores primários do SNC, a partir de dados populacionais dos EUA, é de 7,7 e 5,7 casos novos por 100.000 pessoas-ano para tumores malignos e benignos, respectivamente (Surawicz *et al.*, 1999).

As neoplasias de SNC apresentam algumas particularidades em relação às de outros sítios: a distinção entre a benignidade e malignidade é menos evidente, sendo descritos

tumores com características celulares de benignidade (uniformidade celular e baixo índice de proliferação) e comportamento invasivo. Além disso, a ressecabilidade depende da região anatômica afetada.

Apesar de representarem apenas 2% de todos os cânceres, os tumores malignos primários de SNC apresentam uma taxa de mortalidade desproporcionalmente elevada, de 6,6/100.000 pessoas-ano. A sobrevida geral desses tumores em 5 anos, incluindo todas as idades e todos os tipos histológicos, fica em torno de 17-33% (Berrino *et al.*, 1995; Sant *et al.*, 1998; Surawicz *et al.*, 1999; Johannesen *et al.*, 2003). Nos subtipos histológicos mais comuns, astrocitoma e glioblastoma multiforme, a sobrevida em 5 anos é de 30% e 3,3%, respectivamente (Davis *et al.*, 1998). Nos últimos anos, observou-se uma melhora na sobrevida limitada a determinados subtipos histológicos, como meduloblastomas, com novos protocolos de quimioterapia e radioterapia disponíveis. Para os subtipos mais frequentes, entretanto, especialmente os glioblastomas, não houve mudança na taxa de sobrevida (Sant *et al.*, 1998).

Dentre os fatores prognósticos favoráveis para os tumores primários do SNC, encontram-se menor grau patológico e idade jovem, ausência de alteração mental no momento do diagnóstico, localização cerebelar do tumor, menor tamanho tumoral no pré-operatório e ressecção cirúrgica completa (Wen *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1998).

Em relação à idade, observa-se um pico de incidência de todos os tumores cerebrais primários em torno dos 50 anos, sendo a maioria dos tumores intracranianos diagnosticados em pessoas acima dos 45 anos (Radhakrishnan *et al.*, 1995; Flowers, 2000).

Em adultos, os gliomas (principalmente os astrocitomas) correspondem a 50-80% dos tumores primários sintomáticos do SNC e os meningiomas a 25-30% (Sagar & Israel, 2005). A incidência dos meningiomas pode chegar a 40% quando estudos de neuroimagem

são incluídos, devido ao grande número de pacientes assintomáticos (Radhakrishnan *et al.*, 1995). A maioria dos tumores se localiza na região supra-tentorial (Girolami *et al.*, 1999). Os tumores hipofisários correspondem a 10-20%, linfoma primário do SNC a 3-5% e craniofaringiomas a 1-3% de todos os tumores intracranianos. A predominância com o sexo varia de acordo com o tipo histológico, sendo gliomas mais comuns em homens (1.5:1) e meningiomas mais comuns em mulheres (1.8:1) (Sagar & Israel, 2005).

Os tumores primários do SNC são as neoplasias sólidas mais comuns em menores de 15 anos, compreendendo 20% das neoplasias na infância, 70% localizados na fossa posterior (Girolami *et al.*, 1999). Eles representam a primeira causa de morte por câncer e o segundo tipo de câncer mais comum nessa faixa etária, atrás apenas das leucemias. Os tipos histológicos mais comuns são astrocitomas (40-52%), meduloblastomas/tumores embrionários (20-25%), outros gliomas (10-15%), ependimomas (10%) e craniofaringiomas (5-10%) (National Cancer Institute, 1991; Gurney *et al.*, 1999; Preston-Martin & Baldwin, 2004).

### **3.4.2 Classificação histológica**

A graduação patológica dos tumores primários do SNC, essencial para definir o tratamento e o prognóstico do paciente, é feita baseada na presença ou ausência de atipias nucleares, mitoses, proliferação microvascular e necrose.

Em 1979, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um sistema de classificação para todos os tumores do SNC, que foi subsequentemente revisado em 1993 e 1997. Essa classificação se baseia na premissa de que cada tipo de tumor resulta do crescimento anormal de um tipo celular específico. Atualmente, o sistema da OMS

reconhece dez categorias maiores e 107 subcategorias dos tumores cerebrais, combinando a nomenclatura tumoral com a graduação baseada nos achados histológicos (Tabelas 6 e 7) (Kleihues *et al.*, 1993).

Tabela 6 – Classificação histológica dos tumores do SNC pela OMS

---

1. Tumores do tecido neuroepitelial

1.1 Tumores astrocíticos

1.1.1 Astrocitoma

1.1.1.1 Variante fibrilar

1.1.1.2 Variante protoplásmica

1.1.1.3 Variante gemistocítica

1.1.2 Astrocitoma anaplásico (maligno)

1.1.3 Glioblastoma

1.1.4 Astrocitoma pilocítico

1.1.5 Xantoastrocitoma pleomórfico

1.1.6 Astrocitoma de células gigantes subependimário (esclerose tuberosa)

1.2 Tumores oligodendrogliais

1.2.1 Oligodendroglioma

1.2.2 Oligodendroglioma anaplásico (maligno)

1.3 Tumores ependimários

1.3.1 Ependimoma

1.3.1.1 Variante celular

1.3.1.2 Variante papilar

1.3.1.3 Variante de células claras

---

- 
- 1.3.2 Ependimoma anaplásico (maligno)
  - 1.3.3 Ependimoma mixopapilar
  - 1.3.4 Subependimoma
  - 1.4 Gliomas mistos
    - 1.4.1 Oligo-astrocitoma
    - 1.4.2 Oligo-astrocitoma anaplásico (maligno)
    - 1.4.3 Outros
  - 1.5 Tumores de plexo coróide
    - 1.5.1 Papiloma de plexo coróide
    - 1.5.2 Carcinoma de plexo coróide
  - 1.6 Tumores epiteliais de origem indeterminada
    - 1.6.1 Astroblastoma
    - 1.6.2 Espongioblastoma polar
    - 1.6.3 *Gliomatosis cerebri*
  - 1.7 Tumores neuronais e neurogliais mistos
  - 1.8 Tumores de pineal
    - 1.8.1 Pineocitoma
    - 1.8.2 Pineoblastoma
    - 1.8.3 Tumores de pineal mistos / transicionais
  - 1.9 Tumores embrionários
    - 1.9.1 Meduloepitelioma
    - 1.9.2 Neuroblastoma
      - 1.9.2.1 Variante ganglioneuroblastoma
-

---

1.9.3 Ependimoblastoma

1.9.4 Tumores neuroectodérmicos primitivos

1.9.4.1 Meduloblastoma

1.9.4.1.1 Variante meduloblastoma desmoplástico

1.9.4.1.2 Variante medulomioblastoma

1.9.4.1.3 Variante meduloblastoma melanocítico

2. Tumores dos nervos espinhais e cranianos

2.1 Schwannoma

2.1.1 Variante celular

2.1.2 Variante plexiforme

2.1.3 Variante melanocítica

2.2 Neurofibroma

2.2.1 Circunscrito

2.2.2 Plexiforme

2.3 Neurofibroma anaplásico (maligno)

2.3.1 Variante epitelióide

2.3.2 Variante divergente mesenquimal e/ou com diferenciação epitelial

2.3.3 Variante melanocítica

3. Tumores das meninges

3.1 Tumores de células meningoteliais

3.1.1 Meningioma

3.1.1.1 Variante meningotelial

3.1.1.2 Variante fibroblástica

---



---

3.1.1.3 Variante transicional (mista)

3.1.1.4 Variante psamomatosa

3.1.1.5 Variante angiomatosa

3.1.1.6 Variante microcística

3.1.1.7 Variante secretora

3.1.1.8 Variante de células claras

3.1.1.9 Variante cordóide

3.1.1.10 Variante linfoplasmocitária

3.1.1.11 Variante metaplásica

3.1.2 Meningioma atípico

3.1.3 Meningioma papilar

3.1.4 Meningioma anaplásico (maligno)

3.2 Tumores mesenquimais não meningoteliais

Neoplasias benignas

3.2.1 Tumores osteocartilaginosos

3.2.2 Lipoma

3.2.3 Histiocitoma fibroso

3.2.4 Outros

Neoplasias malignas

3.2.5 Hemangiopericitoma

3.2.6 Condrosarcoma

3.2.6.1 Variante mesenquimal

3.2.7 Histiocitoma fibroso maligno

---

- 
- 3.2.8 Rbdomiosarcoma
  - 3.2.9 Sarcomatose meningeal
  - 3.2.10 Outros
  - 3.3 Lesões melanocíticas primárias
    - 3.3.1 Melanose difusa
    - 3.3.2 Melanocitoma
    - 3.3.3 Melanoma maligno
      - 3.3.3.1 Variante melanomatose meningeal
  - 3.4 Tumores de histogênese indeterminada
    - 3.4.1 Hemangioblastoma
  - 4. Linfomas e neoplasias hematopoéticas
    - 4.1 Linfoma maligno
    - 4.2 Plasmocitoma
    - 4.3 Sarcoma granulocítico
    - 4.4 Outros
  - 5. Tumores de células germinativas
    - 5.1 Germinoma
    - 5.2 Carcinoma embrionário
    - 5.3 Tumor do seio endodérmico
    - 5.4 Coriocarcinoma
    - 5.5 Teratoma
      - 5.5.1 Imaturo
      - 5.5.2 Maduro
-

5.5.3 Teratoma com transformação maligna

5.6 Tumores mistos de células germinativas

6. Lesões císticas e *tumour-like*

6.1 Cisto de Rathke

6.2 Cisto epidermóide

6.3 Cisto dermóide

6.4 Cisto colóide do terceiro ventrículo

6.5 Cisto enterogêneo

6.6 Cisto neuroglial

6.7 Tumores de células granulares

6.8 Hamartoma neuronal hipotalâmico

6.9 Heterotopia nasal glial

6.10 Granuloma de células plasmáticas

7. Tumores da região selar

7.1 Adenoma hipofisário

7.2 Carcinoma hipofisário

7.3 Craniofaringioma

7.3.1 Variante adamantinosa

7.7.2

7.

---

8.4 Condrosarcoma

8.5 Carcinoma

9. Tumores metastáticos

10. Tumores não-classificáveis

---

Tabela 7. Graduação dos tumores de células gliais

Classificação da OMS	Graduação da OMS	Crítérios Histológicos
Astrocitoma ou gliomas de baixo grau (pilocítico, difuso)	Grau I	Aumento da celularidade
Astrocitoma ou gliomas de baixo grau (pilocítico, difuso)	Grau II	Atipias celulares
Astrocitoma anaplásico (maligno)	Grau III	Mitoses
Glioblastoma	Grau IV	Alta taxa de mitoses, proliferação endotelial e necrose

### 3.4.3 Características dos principais tumores do SNC

Tumores de tecido neuroepitelial

O termo “glioma” se refere a tumores originados das células gliais, isto é, astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais. Astrocitoma é uma denominação genérica aplicada a tumores difusamente infiltrativos compostos por astrócitos neoplásicos diferenciados. São, por definição, gliomas ou tumores astrocíticos de baixo grau (I e II) com aumento da

celularidade e atipias, mas ausência de mitoses, proliferação endotelial ou necrose. Exemplos incluem os astrocitomas pilocítico e difuso (este último é o subtipo histológico mais comum) (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000). Ocorrem tipicamente em adultos jovens, com pico de incidência na quarta e quinta décadas de vida, e podem se localizar em todo o SNC, preferencialmente na região fronto-temporal dos hemisférios cerebrais (Lantos *et al.*, 2002). Eles apresentam uma ampla variedade de manifestações histopatológicas e de comportamento biológico, além da tendência de progressão para um fenótipo mais maligno, e da recorrência após ressecção cirúrgica incompleta.

Astrocitomas anaplásicos ou malignos são considerados gliomas de grau III, e exibem mitoses, mas não proliferação endotelial ou necrose. Esses tumores são caracterizados por uma anaplasia focal ou difusa, com aumento da celularidade, pleomorfismo celular, atipias nucleares e atividade mitótica. Podem derivar de astrocitomas de menor grau, e apresentam uma tendência inerente e geralmente rápida de progressão para glioblastoma (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000). O prognóstico desfavorável dos astrocitomas se deve em grande parte à sua capacidade de infiltrar o tecido cerebral adjacente. Desse modo, a ressecção cirúrgica completa é raramente atingida, e o re-crescimento tumoral é freqüente (Lantos *et al.*, 2002).

Glioblastomas são astrocitomas de grau IV, e se caracterizam por uma alta atividade mitótica associada à proliferação endotelial e/ou necrose. Compreendem a neoplasia de origem astrocitária mais maligna e menos diferenciada, composta por células pleomórficas, fusiformes, pouco diferenciadas e ocasionalmente células gigantes multinucleares, além dos achados histológicos de proliferação vascular e/ou necrose, essenciais para seu diagnóstico (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000). Glioblastomas são tumores cerebrais freqüentes, afetam principalmente adultos, com pico de incidência na sexta década de vida.

Tipicamente se localizam nos hemisférios cerebrais. Podem se originar de oligodendrogliomas ou de astrocitomas de baixo grau, quando são denominados “glioblastomas secundários” (Lantos *et al*, 2002).

#### Tumores oligodendrogliais

Tumores oligodendrogliais são compostos predominantemente de oligodendrócitos neoplásicos, e subdividem-se, segundo a OMS, em oligodendrogliomas e oligodendrogliomas anaplásicos. Oligodendrogliomas são neoplasias de crescimento lento, que ocorrem geralmente na idade adulta, com pico de incidência entre a quarta e quinta décadas, afetando preferencialmente substância branca cerebral e núcleos da base. A progressão tumoral para anaplasia completa ocorre menos freqüentemente que nos astrocitomas (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000). Costumam ser difusamente infiltrativos de uma maneira não destrutiva (Coons & Johnson, 1994). Histologicamente correspondem ao grau II. Por outro lado, o oligodendroglioma anaplásico exibe anaplasia focal ou difusa, com celularidade aumentada, polimorfismo nuclear e altas taxas mitóticas. Ocasionalmente pode apresentar células gigantes multinucleares, proliferação vascular e focos de necrose. Essa neoplasia corresponde histologicamente ao grau III, mas pode progredir com anaplasia completa morfologicamente indistinguível dos glioblastomas (grau IV) (Kleihues *et al*, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000).

#### Tumores ependimais

Ependimomas são tumores originados de células ependimais ou subependimais periventriculares ou circunjacentes ao cordão espinhal, moderadamente celulares e com baixa atividade mitótica. Geralmente são considerados tumores de baixo grau (grau II da OMS). Ependimomas intracranianos ocorrem mais em crianças e tendem a se expandir para

o interior dos ventrículos. Já os espinhais são geralmente diagnosticados em adultos, localizados mais na região lombossacra. Apresentam crescimento lento e são normalmente bem delimitados em relação às estruturas cerebrais adjacentes.

Ependimomas anaplásicos são tumores com anaplasia franca, traduzida por alta celularidade, atipias nucleares variadas, marcada atividade mitótica e proliferação vascular proeminente, correspondendo ao grau histológico III da OMS (Kleihues *et al.*, 1993).

#### Tumores embrionários – Tumores Neuroectodérmicos Primitivos (PNET)

PNET são tumores que apresentam uma célula progenitora em comum, que pode sofrer transformação maligna em vários níveis do SNC, ocasionando tumores de comportamento morfológico e biológico similares.

PNET são tumores malignos de pequenas células que ocorrem em crianças, preferencialmente de localização cerebelar, e apresentam uma notável capacidade de diferenciação divergente, incluindo neuronal, astrocítica, ependimal, muscular e melanocítica.

Meduloblastomas são tumores de células embrionárias geralmente pequenos, de coloração azulada, tipicamente ocorrendo na infância e localizando-se no teto do quarto ventrículo e cerebelo. Apresentam atividade mitótica variável e ocasionalmente focos de necrose. Esses tumores tendem a infiltrar o tecido adjacente e invadir as meninges. Correspondem a grau histológico IV.

Histologicamente, tumores idênticos podem ocorrer em outras áreas, sendo denominados de acordo com sua localização em ependimoblastomas, neuroblastomas ou pineoblastomas (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000).

### Tumores de nervos cranianos e espinhais

Schwanomas são tumores encapsulados e algumas vezes císticos compostos por células de Schwann neoplásicas. Observam-se dois padrões histológicos na maioria das lesões, um com áreas densamente celulares com células alongadas compactas em paliçada (Antoni A), e outro menos celular, com células contendo material lipídico (Antoni B). Pode haver pigmentação devido ao acúmulo de lipofuscina, hemossiderina ou, excepcionalmente, melanina. Podem derivar de qualquer nervo espinhal ou craniano, mas na sua maioria envolvem o nervo acústico. Correspondem à graduação histológica I (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000).

### Tumores de células meningoteliais

Meningiomas são tumores benignos compostos de células meningoteliais (aracnóides) neoplásicas. Apesar da maioria dos meningiomas estarem ligados à duramater, particularmente em áreas de maior concentração das vilosidades aracnóides, alguns podem ocorrer em sítios não usuais, como estroma do plexo coróide (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000). Meningiomas são mais comuns em mulheres (1,8:1,0) de meia idade, e observa-se uma relação com câncer de mama, provavelmente refletindo a estimulação de hormônios sexuais agindo como fatores de crescimento (Lantos *et al.*, 2002). Podem ocorrer em qualquer localização do neuroeixo, incluindo sítios intracraniais, espinhais, intraventriculares e extracraniais. Observam-se meningiomas dentro do parênquima cerebral, derivando de células aracnóides perivasculares. Em sua maioria são bem delimitados, mas não encapsulados, podendo apresentar projeções *finger-like* penetrando o tecido mesenquimal adjacente. Microscopicamente são reconhecidos diversos subtipos histológicos, geralmente com comportamento biológico semelhante, incluindo



meningotelial, fibroblástico, transicional, psamomatoso, angiomatoso, entre outros, que exibem tendência à recorrência e correspondem ao grau histológico I (Kleihues *et al.*, 1993). Mais de 80% dos meningiomas benignos são das classes meningotelial, transicional ou fibroblástica (Lantos *et al.*, 2002).

Meningiomas atípicos têm atividade mitótica aumentada (mais de 4 mitoses por 10 campos) ou 3 ou mais dos seguintes: aumento de celularidade, aumento da relação núcleo/citoplasma celular, nucléolos proeminentes, necrose, padrão de crescimento em camadas. É importante salientar que atipias nucleares isoladas ou simplesmente invasão da dura ou óssea não qualificam um meningioma como “atípico”. Esses tumores apresentam uma tendência aumentada à recorrência e correspondem ao grau histológico II.

Meningiomas anaplásicos ou malignos apresentam citologia maligna franca (similaridade com sarcomas, carcinomas ou melanomas), índice mitótico muito elevado (mais de 20 mitoses por 10 campos) e necrose. Correspondem ao grau histológico III (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues & Cavenee, 2000).

#### **3.4.4 Fatores de risco**

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar risco ocupacional e ocorrência de tumores cerebrais em diversos setores, como trabalhadores em laboratório, indústria petroquímica, eletricitas e agricultores. Entretanto, os achados são inconsistentes, devido à pequena magnitude da amostragem e à imprecisão dos métodos de avaliação da exposição (Greenwald *et al.*, 1981; Lin *et al.*, 1985; McLaughlin *et al.*, 1987; Schlehofer *et al.*, 1990).

Até o momento, apenas a exposição a altas doses de radiação ionizante comprovadamente se associou à maior ocorrência de tumores cerebrais, especialmente

gliomas e meningiomas (Modan *et al.*, 1974; Marconi & Parenti, 1997; Strojjan *et al.*, 2000; Preston *et al.*, 2002). Em um estudo do tipo coorte com aproximadamente 10.000 crianças tratadas para leucemia linfocítica aguda, observou-se um risco aumentado em 22 vezes para tumores primários do SNC nas submetidas à irradiação craniana, principalmente astrocitomas (Neglia *et al.*, 1991).

Um estudo de caso-controle foi desenvolvido para avaliar o impacto do uso de telefone celular (radiação de radiofrequência) na ocorrência de tumores cerebrais, obtendo um risco relativo com o uso cumulativo de mais de 100h desses aparelhos de 1,0 para todos os tumores do SNC; 0,9 para gliomas; 0,7 para meningiomas; e, 1,4 para neurinomas do acústico (Inskip *et al.*, 2001).

A associação de trauma craniano com maior ocorrência de tumores cerebrais foi sugerida em alguns estudos de caso-controle, especialmente para meningiomas (Preston-Martin *et al.*, 1989) e neurinomas do acústico (Preston-Martin *et al.*, 1989), mas não evidenciada em outro (Burch *et al.*, 1987). Uma relação causal é geralmente de difícil comprovação, apesar dessa associação ser biologicamente plausível devido à intensa gliose proliferativa induzida pelo trauma.

Estudos sobre risco de neoplasias cerebrais e componentes dietéticos, antioxidantes, consumo de álcool e tabaco são conflitantes e não demonstraram resultados convincentes até o momento (Giles *et al.*, 1994; Hurley *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1997).

Acredita-se que desarranjos moleculares, como mutações gênicas em regiões específicas, estão relacionados a alguns tipos de tumores do SNC, embora ainda não se saiba ao certo quais os fatores indutores e promotores dessa replicação celular errônea. Mutação de inativação do p53 (gene supressor tumoral) é uma das alterações genéticas

mais freqüentemente observada em glioblastomas e astrocitomas difusos (Lantos *et al.*, 2002).

Diversos mecanismos participam da gênese das células gliais e da regulação das células-tronco neurais. Nessa linha, a amplificação do gene do receptor do fator de crescimento epitelial (EGF) se associa com a formação de glioblastomas, e a ativação desse mesmo receptor promove o crescimento de células tronco neurais, de astrócitos e de seus precursores (Reynolds *et al.*, 1992; Sanai *et al.*, 2005). Ainda, o gene supressor tumoral *PTEN* encontra-se afetado em gliomas de alto grau e glioblastomas (Groszer *et al.*, 2001), bem como descreve-se amplificação do receptor do fator de crescimento epitelial e deleções do p16 associadas a glioblastomas primários (Ohgaki, 2005).

Neste contexto, ainda é pouco explorado o papel dos fatores hormonais, entre eles a PRL, na gênese e no desenvolvimento desses tumores.

### **3.4.5 Manifestações clínicas**

Os tumores centrais podem manifestar-se clinicamente por deficiência neurológica focal ou sintomas generalizados refletindo aumento da pressão intracraniana, como cefaléia, alteração do sensório, náuseas e vômitos (Tabela 8). Esses sintomas podem surgir precocemente ou tardiamente no curso da doença, dependendo do tipo tumoral e sua localização (DeAngelis, 2001). Geralmente história clínica curta, de evolução progressiva e rápida instalação de hipertensão intracraniana, associa-se com glioblastomas e tumores biologicamente mais agressivos (Lantos *et al.*, 2002).

Cefaléia é um sintoma comum em pacientes com tumores cerebrais, ocorrendo em torno de 50% dos casos (Forsyth & Posner, 1993; Pfund *et al.*, 1999). Fatores sugestivos de

presença de tumor intracraniano em pacientes com cefaléia incluem náuseas e vômitos, piora no padrão da dor, exame neurológico anormal e piora da dor de acordo com a posição do paciente.

Crises convulsivas são achados iniciais comuns nesses pacientes, ocorrendo em 18-45% dos casos, podendo ser generalizadas ou focais (Cascino, 1990; Schaller & Rüegg, 2003). Outros sinais e sintomas focais variam de acordo com a localização da lesão, como afasia, paralisia de nervos cranianos e hemiparesias. A frequência, a progressão e a intensidade desses sintomas parecem ser indicativas do tipo de tumor, sendo hemiparesias de evolução rápida mais comumente associadas a tumores de alto que de baixo grau (DeAngelis, 2001).

Tabela 8. Manifestações clínicas dos tumores cerebrais

Cefaléia	Crises convulsivas generalizadas
Náuseas e vômitos	Crises convulsivas focais
Disfunção neurocognitiva	Afasia
Disfunção visual	Perda sensorial

### 3.4.6 Diagnóstico

Imagem neurorradiológica é o procedimento diagnóstico de eleição para os tumores cerebrais, revelando exatos tamanho e localização da lesão. A ressonância magnética de encéfalo (RNM) com gadolínio, além de permitir a visualização da lesão e sua relação com

as estruturas circunjacentes, é superior à tomografia computadorizada (TC) na avaliação das meninges, do espaço subaracnóideo, da fossa posterior e de alterações vasculares (DeAngelis, 2001; Tzika *et al.*, 2002). Por outro lado, a TC é preferida quando se precisa avaliar comprometimento ósseo e detectar metástases na base do crânio (DeAngelis, 2001). Em ambas, a impregnação com contraste intravascular ocorre quando há vazamento do mesmo para o parênquima cerebral. Desse modo, a impregnação denota uma falha na barreira hemato-encefálica, um achado inespecífico observado em diversas situações, como neoplasias, infecções e infartos. Microscopicamente correspondente à impregnação tem-se alta celularidade e atividade mitótica neoplásica com proliferação vascular e de células do estroma. Ao redor da área de impregnação observam-se graus variados de edema cerebral (região de hipodensidade à TC e hipersinal em T2 à RNM) (Coons & Johnson, 1994).

Diversas características imagenológicas ajudam na distinção do tipo de tumor cerebral, como localização da lesão e sua relação com as estruturas adjacentes, envolvimento ósseo ou da dura, erosões ósseas ou hiperostoses. Multiplicidade de lesões

agressividade da lesão, e hipervascularização (regiões lineares serpentinosas intratumorais) pode ser observada em hemangioblastomas e glioblastomas (Batnitzky & Eckard, 1994).

Revisando as características imagenológicas dos tumores cerebrais mais comuns, tem-se que os astrocitomas de baixo grau se apresentam aos exames de neuroimagem como uma lesão expansiva homogênea, bem delimitada, de baixa densidade em relação ao parênquima cerebral adjacente, sem impregnação de contraste. À RNM são hipointensos em T1 e com discreto hipersinal em T2, permitindo definição mais clara das bordas. Já os astrocitomas anaplásicos apresentam impregnação parcial pelo contraste e edema perifocal. A extensão da anormalidade do sinal em T2 é geralmente o estudo de imagem mais acurado para avaliar a extensão da infiltração de células tumorais em gliomas. Diferentemente, os glioblastomas se caracterizam tipicamente por uma lesão expansiva com bordos irregulares e zona de impregnação de contraste semelhante a um anel ao redor da lesão hipointensa traduzindo necrose central. À RNM, os oligodendrogliomas são tipicamente lesões discretas de baixa densidade, com pouca ou nenhuma impregnação pelo contraste. Calcificação é aparente à TC, e também podem ser observadas hemorragia e formação cística. Por sua vez, os ependimomas se traduzem por lesões expansivas hipo ou isointensas em T1 e hiperintensas em T2, geralmente com expansão e preenchimento ventricular. Calcificações e conteúdo cístico podem ser observados e hidrocefalia é um achado bastante comum. Já os meduloblastomas são tumores que envolvem o quarto ventrículo e geralmente invadem o cerebelo. Mostram-se como lesões hiperintensas com impregnação de contraste moderada a forte, circundadas por halo hipodenso que reflete edema perifocal. Áreas hipointensas intratumorais, correspondentes a cistos e focos de necrose, e calcificações podem ser visualizadas. Em relação aos meningiomas, geralmente observa-se uma massa lobulada de limites bem definidos, isointensa em T1, em associação direta com

a duramáter. Essas lesões podem ser parcialmente calcificadas, apresentam impregnação homogênea do contraste, usualmente se associam com edema peritumoral e, nos meningiomas atípicos, com graus variados de necrose, hemorragia e formações císticas. Hiperostose e erosões ocorrem freqüentemente no osso adjacente ao meningioma (Coons & Johnson, 1994).

A tomografia com emissão de pósitrons (PET scan) com fluorodeoxiglicose permite a localização das áreas de maior utilização de glicose dentro do tumor, guiando o neurocirurgião para biopsiar os locais de comportamento biológico tumoral mais agressivo. Ela pode, ainda, auxiliar na diferenciação de tumores de alto (hipermetabolismo de glicose) e baixo grau (hipometabolismo de glicose) (Hanson *et al.*, 1991; Janus *et al.*, 1993; Bittar *et al.*, 1999).

O diagnóstico definitivo dos tumores cerebrais é feito através da histologia. Na maioria dos pacientes, essa confirmação histológica é obtida no momento da ressecção cirúrgica.

### **3.4.7 Tratamento**

O tratamento dos tumores do SNC depende de sua localização, da idade e das condições do paciente. Intervenção cirúrgica com remoção completa da lesão pode ser suficiente em tumores de baixo grau, apesar de infreqüente. Quando a ressecção cirúrgica é incompleta, ou quando o tumor é biologicamente mais agressivo, geralmente é necessária terapia adicional, como quimioterapia e radioterapia, dependendo da sensibilidade tumoral. Eventualmente pode-se indicar apenas acompanhamento clínico de pacientes com astrocitoma de baixo grau, com exames neurológicos e de imagem seriados.

## PARTE II – INTER-RELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS EM ESTUDO E O SNC

### 3.5 PRL extra-hipofisária

A descrição de células nervosas contendo PRL data de décadas. A PRL é detectável em muitos sítios hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos no sistema nervoso central, e deriva basicamente de duas origens: transporte pela circulação sanguínea e síntese local (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). O transporte da PRL até o líquido ocorre pela captação da PRL hipofisária liberada na circulação sanguínea, mediada pelos R-PRL no plexo coróide. R-PRL são identificados em alta densidade nos núcleos dorsomedial, ventromedial, supra-óptico e paraventriculares hipotalâmicos e no plexo coróide (Freeman *et al.*, 2000). Foram descritas também fibras nervosas contendo PRL no núcleo central da amígdala, núcleos da rafe e *locus ceruleus*. Em análise molecular, esse hormônio já foi descrito na membrana sináptica, em axônios e dendritos. Todavia, o papel da prolactina de origem neural no SNC como neurotransmissor, neuromodulador ou regulador de citocinas ainda não está estabelecido (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000).

Dentre funções descritas para a PRL no SNC destacam-se a participação na regulação da síntese dopaminérgica, do ciclo sono-vigília, do comportamento sexual e parental, da mitogênese de astrócitos (DeVito *et al.*, 1992), da liberação do CRH e do GnRH e da composição do líquido, embora pouco se saiba sobre sua relevância nesses fenômenos (Ben-Jonathan *et al.*, 1996).



### **3.6 Receptor de PRL: R-PRL**

A presença de R-PRL específicos foi demonstrada em diversas áreas do SNC, incluindo a área postrema circumventricular (Mangurian *et al.*, 1999) do tronco cerebral, amígdala, plexo coróide, bulbo olfativo, e núcleos supraquiasmático, pré-óptico e hipotalâmico ventral (Hasunuma *et al.*, 2005). Não se observou expressão do gene do R-PRL no córtex cerebral (Chiu & Wise, 1994).

O local de maior densidade da expressão dos R-PRL no SNC é no plexo coróide, em que funcionam como transportadores, permitindo o acesso da PRL circulante a diversas regiões cerebrais (Ben-Jonathan *et al.*, 1996).

### **3.7 Prolactina, receptores hormonais e tumores primários do SNC**

A relação entre PRL e tumores do SNC chama atenção desde 1980, quando os primeiros relatos de hiperprolactinemia associada a tumores do SNC foram descritos. Shah *et al.*, em 1980, descreveram dois casos de amenó-galactorréia associados a meningioma paraselar, seguidos por Kolodny & Diuhy que, em 1985, relataram um caso de hiperprolactinemia associada à lesão expansiva, responsiva a agonista dopaminérgico, mas sem redução tumoral, que no estudo histológico mostrou tratar-se de um meningioma. Mais recentemente, foram publicados um caso de hiperprolactinemia acentuada (PRL de 1440ng/dL) associada a gangliocitoma com imunoistoquímica positiva para PRL (McCowen *et al.*, 1999) e a associação de hiperprolactinemia e cisto epidermóide de terceiro ventrículo (Santosh & Rajshekhar, 2001).

Com efeito, estudos experimentais sugerem que a presença de PRL estimula a mitogênese de células tumorais no SNC, seja diretamente, ou indiretamente através da produção de um fator de crescimento celular. Nessa linha, a PRL induziu a liberação de óxido nítrico via aumento da ação da óxido nítrico sintase em culturas de células de glioma em ratos (Raso *et al.*, 1999). Em seres humanos, estudos observaram que a incubação de células de meningiomas com PRL aumentou o índice de replicação celular de forma dose-dependente (Jimenez-Hakime *et al.*, 1993; Muccioli *et al.*, 1997). Um trabalho recente demonstrou que a PRL induz o aumento de cálcio intracelular em células de glioblastoma, aumentando também a incorporação de timidina, o crescimento celular e a vida-média dessas células (Ducret *et al.*, 2002).

Acredita-se que os meningiomas sofram influência hormonal devido à maior incidência em mulheres em idade fértil, associação com carcinoma de mama e exacerbação dos sintomas durante a gravidez e a fase luteal do ciclo menstrual (Mehta *et al.*, 1983; Carroll *et al.*, 1999). Desse modo, alguns estudos avaliaram a presença de receptores de hormônios sexuais em tumores do SNC, com achados conflitantes.

Em relação à expressão de R-PRL, Ciccareli *et al.* em uma série de 42 tumores de SNC, demonstraram hiperprolactinemia e presença de R-PRL em 27,3% e 45,4% dos meningiomas, respectivamente. Já nos schwannomas, a PRL estava elevada em 61,5% e 69,2% mostravam-se R-PRL positivos (Ciccareli *et al.*, 2001). Neste trabalho, não houve correlação entre a positividade de R-PRL e a ocorrência de hiperprolactinemia (Ciccareli *et al.*, 2001). O sistema dopaminérgico, principal regulador inibitório da PRL, também foi relacionado à cinética celular dos tumores de SNC. Schrell *et al.* verificaram a presença de receptores D1 da dopamina em cultura de células de meningiomas e que, quando essas células eram incubadas com um agonista dopaminérgico, ocorria uma menor proliferação

celular (Schrell *et al.*, 1990). A presença de receptores dopaminérgicos nessas neoplasias também foi descrita por Carroll, em 1996, que verificaram a presença de RNAm para receptor D1 em 69%, D2 em 100% e R-PRL em 57% dos meningiomas estudados (Carroll *et al.*, 1996). Alta positividade (61,7%) para R-PRL também foi evidenciada em meningiomas por Muccioli e colaboradores (Muccioli *et al.*, 1997).

Ainda em meningiomas, observou-se uma expressão reduzida de receptores de estrógeno em pacientes com meningiomas atípicos e associação da perda da expressão de receptores de progesterona com maior índice de apoptose e de recorrência precoce (Konstantinidou *et al.*, 2003). Hsu *et al.*, em 1997, também demonstraram correlação positiva entre ausência de receptor de progesterona, alto índice mitótico e maior grau tumoral em meningiomas. Ao contrário, Rubinstein *et al.*, 1994, demonstraram uma expressão significativamente maior de receptor de progesterona em meningiomas recorrentes. Além disso, há descrição de RE em 0% (Markwalder *et al.*, 1984; Hilbig & Barbosa-Coutinho, 1998) e 33% (Rubinstein *et al.*, 1994) dos meningiomas em humanos, e 6,7% em animais (Adamo *et al.*, 2003). Em outro estudo, avaliou-se a expressão dos dois RE por PCR, demonstrando-se positividade de 68% para RE alfa e 44% para RE beta (Carroll *et al.*, 1999).

Konstantinidou *et al.*, em 2003, encontraram expressão de receptores de progesterona, estrógeno e andrógeno em 75,5%, 35,4% e 28,6% dos tumores intracranianos primários analisados, respectivamente.

Em gliomas e astrocitomas, receptores de andrógenos e glicocorticóides foram identificados em 100% dos casos (Carroll *et al.*, 1995), receptores de progesterona em 87,5% (Vaquero *et al.*, 1983) e 100% dos casos (Carroll *et al.*, 1995), receptores de estrógeno em 0% (Vaquero *et al.*, 1983; Carroll *et al.*, 1995; Assimakopoulou *et al.*, 1998)

e 50% dos casos (Glick *et al.*, 1983), e antígeno relacionado ao receptor de estrógeno (ER-D5) em 62% dos casos (Khalid *et al.*, 1995). Neste último trabalho, observou-se maior positividade de ER-D5 em tumores de alto grau (Khalid *et al.*, 1995). Em células de tumores neuroectodérmicos primitivos também se observou a presença de receptores de estrógeno alfa e beta (Kirby *et al.*, 2004). Em craniofaringiomas observou-se expressão de RE em 30% dos casos, estando a ausência deste associada à maior incidência de recrescimento tumoral pós-operatório (Izumoto *et al.*, 2005). Correlação significativa entre imunoreatividade fraca ou ausente de RE beta e maior grau tumoral foi demonstrada recentemente (Batistatou *et al.*, 2004) em astrocitomas.

Do ponto de vista endócrino, críticas podem ser feitas ao tratamento dado à constatação de “hiperprolactinemia” em alguns destes trabalhos, uma vez que nem sempre foram especificados os critérios que determinaram o diagnóstico de hiperprolactinemia. Devem ser excluídas situações fisiológicas (ex: gravidez), farmacológicas ou patológicas que expliquem sua etiologia. No entanto, as causas secundárias de hiperprolactinemia nem sempre têm merecido a atenção quando da seleção dos pacientes. Eventualmente é mencionada a exclusão de gravidez, hipotireoidismo, insuficiência renal, doença hepática e uso de drogas potencialmente hiperprolactinêmicas.

### **3.8 MIB-1 e tumores primários do SNC**

O índice Ki-67 tem se mostrado um marcador acurado da proliferação celular em espécies tumorais, sendo descrito como fator preditor de mau prognóstico em diversos tumores (Petrowsky *et al.*, 2001; Quiñones-Hinojosa *et al.*, 2005). Em relação aos tumores do SNC, o índice Ki-67 é amplamente aceito na avaliação do grau de replicação celular

(Petrowsky *et al.*, 2001). Todavia, o impacto prognóstico desse marcador na evolução dos tumores do SNC ainda não é consenso na literatura. Nessa linha, um estudo em adenomas hipofisários demonstrou um índice Ki-67 significativamente maior nos tumores invasivos em relação aos não-invasivos (Pizarro *et al.*, 2004). Outros estudos demonstraram correlação positiva entre índices mais elevados de Ki-67 e menor tempo de sobrevida em gliomas (Montine *et al.*, 1994; Wakimoto *et al.*, 1996). Em craniofaringiomas, observou-se correlação positiva entre altos índices Ki-67 e recidiva tumoral (Izumoto *et al.*, 2005). Em contrapartida, Bredel e colaboradores demonstraram relação positiva entre alta expressão de Ki-67 e maior tempo de sobrevida em glioblastomas, não observando diferença significativa dos índices de Ki-67 entre diferentes tipos histológicos tumorais estudados (Bredel *et al.*, 2002). Todavia, diversos autores não evidenciaram impacto prognóstico independente do índice Ki-67 nos tumores cerebrais, (Bouvier-Labit *et al.*, 1998; Grzybicki & Moore, 1999; Roser *et al.*, 2004), nem correlação do índice Ki-67 com grau de invasão tumoral (Khoshyomn *et al.*, 1999).

Desse modo, como se pode evidenciar, há relatos de correlação positiva, inversa e ausência de correlação do índice Ki-67 com sobrevida, recidiva e grau de invasão em tumores primários do SNC, permanecendo controverso seu papel na avaliação prognóstica desses tumores.

Em suma, partindo da inter-relação entre a prolactina, o SNC e a proliferação celular, desenvolveu-se o projeto a seguir, que procurou avaliar a concentração sérica de PRL, a presença intracelular de PRL e de receptores de PRL em tumores primários do sistema nervoso central, relacionando os achados com o grau de replicação celular.

## **4.OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar a concentração sérica, a presença intracelular de prolactina e de receptor de prolactina em tumores primários do sistema nervoso central, relacionando os achados com o grau de replicação celular.

### **4.2 Objetivos específicos**

- 1) Avaliar a concentração sérica de prolactina em pacientes com tumores primários do SNC;
- 2) Avaliar, por método imunoistoquímico, a presença intracelular de prolactina em tumores primários do SNC;
- 3) Avaliar, por método imunoistoquímico, a presença de receptores de prolactina em tumores primários do SNC;
- 4) Avaliar, por método imunoistoquímico, o índice Ki-67, pelo MiB-1, em tumores primários do SNC;
- 5) Relacionar os níveis de prolactina sérica, a presença intracelular de PRL, de receptores de PRL e o índice de replicação celular, entre si e com o tipo histológico tumoral;
- 6) Investigar a possível diferença na replicação celular, avaliada pelo MiB-1, na intervenção primária e na reintervenção de tumores primários do SNC.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamo PF, Cantile C, Steinberg H. Evaluation of progesterone and estradiol receptor expression in 15 meningiomas of dogs and cats. *Am J Vet Res* 2003;64:1310-8.
- Akpunonu BE, Mutgi AB, Federman DJ, York J, Woldenberg LS. Routine prolactin measurement is not necessary in initial evaluation of male impotence. *J Gen Inter Med* 1994;9:336-8.
- Arroba AI, Frago LM, Argente J, Chowen JA. Oestrogen requires the insulin-like growth factor-I receptor for stimulation of prolactin synthesis via Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Neuroendocrinol* 2005;17:97-104.
- Asa SL, Kovacs K, Horvath E, Losinski NE, Laszlo FA, Domokos I, Halliday WC. Human fetal adenohypophysis. *Neuroendocrinology* 1988;48:423-431.
- Asa SL, Kovacs K, Laszlo FA, Domokos I, Ezrin C. Human fetal adenohypophysis. *Neuroendocrinology* 1986;43:308-316.
- Asa SL, Kovacs K, Melmed S. The hypothalamic-pituitary axis. In: Melmed S (ed). *The Pituitary*. Boston: Blackwell Scientific Publication, 1995:3-44.
- Asa SL, Penz G, Kovacs K, Ezrin C. Prolactin cells in the human pituitary. A quantitative immunocytochemical analysis. *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:360-363.
- Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Varakis J. Does sex steroid receptor status have any prognostic or predictive significance in brain astrocytic tumors? *Clin Neuropathol* 1998;17:27-34.
- Balfe P, McCann A, McGoldrick A, McAllister K, Kennedy M, Dervan P, Kerin MJ. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  profiling in human breast cancer. *EJSO* 2004;30:469-74.

- Batistatou A, Stefanou D, Goussia A, Arkoumani E, Papavassiliou AG, Agnantis NJ. Estrogen receptor beta is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:405-10.
- Batnitzky S, Eckard DA. The radiology of brain tumors: general considerations and neoplasms of the posterior fossa. In: Morantz RA, Walsh JW. (eds) *Brain tumors: a comprehensive text*. New York:Merzel Dekker:1994.p.213-271.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001;22:724-63.
- Ben-Jonathan N, Karen L, Molly M, Zinger M. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:245-9.
- Ben-Jonathan N, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev* 1996;17:639-69.
- Berrino F, Sant M, Verdecchia A, Capocaccia R, Hakulinen T, Esteve J (eds). *Survival of cancer patients in Europe. The EURO CARE Study*. IARC Scientific Publication no. 132. Lyon, International Agency for Research on Cancer 1995.
- Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah NG, Karelia NH, Vora HH, Ghosh N, Suthar TP, Balar DB. Prognostic value of insulin-like growth factor-1 receptors in patients with colon/rectal cancer: correlation with plasma prolactin. *Eur J Surg Oncol* 1995;21:23-6.
- Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah NG, Vora HH, Suthar TP, Ghosh N, Chikhlikar PR, Trivedi TI. Prolactin as a local growth promoter in patients with breast cancer: GCRI experience. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:540-7.



- Bhatavdekar JM, Vora H, Balar D, Patel D, Shah N, Karelia N, Chiklikar P, Ghosh N, Dave R. Interrelationship of prolactin and its receptor in carcinoma of the colon and rectum: a preliminary report. *J Surg Ocol* 1994;55:246-9.
- Biller BM, Baum HB, Rosenthal DI, Saxe VC, Charpie PM, Klibanski A. Progressive trabecular osteopenia in women with hyperprolactinemic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:692-7.
- Bittar RG, Oliver A, Sadikot AF, Andermann F, Pike GB, Reutens DC. Presurgical motor and somatosensory cortex mapping with functional magnetic resonance imaging and positron emission tomography. *J Neurosurg* 1999;91:915-21.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998;19:225-68.
- Bonnetterre J, Mauriac L, Weber B, Roche H, Fargeot P, Turbiana-Hulin M, Sevin M, Chollet P, Cappelaere P. Tamoxifen plus bromocriptine versus tamoxifen plus placebo in advanced breast cancer: results of a double blind multicentre clinical trial. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:1851-3.
- Bonnetterre J, Peyrat JP, Vandewalle B, Beuscart R, Vie MC, Cappelaere P. Prolactin receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982;18:1157-62.
- Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djane J, Kelly PA. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 1988;53:69-77.

- Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C, Gambarelli D, Dufour H, Figarella BD, Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24:381-8.
- Bredel M, Piribauer M, Marosi C, Birner P, Gatterbauer B, Fischer I, Ströbel T, Rossler K, Budke H, Hainfellner A. High expression of DNA topoisomerase II $\alpha$  and Ki-67 antigen is associated with prolonged survival in glioblastoma patients. *Eur J Cancer* 2002;38:1343-7.
- Brugal G. Interpretation of proliferation markers. In: Holfstädter F, Knüchel R, Ruschoff J. Meeting Report - Cell Proliferation Assessment in Oncology. *Virchows Arch*, 1995;427:323-41.
- Bruno S, Dazykiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody and HL-60 cells. *Cell Prolif* 1992;25:31-40.
- Burch JD, Craib KJ, Choi BC, Miller AB, Rischita, Howe GR. An exploratory case-control study of brain tumors in adults. *J Natl Cancer Inst* 1987;78:601-9.
- Carlson HE. Prolactin stimulation by protein is mediated by amino acids in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:7-14.
- Carroll RS, Schrell UM, Zhang J, Dashner K, Nomikos P, Fahlbusch R, Black PM. Dopamine D1, dopamine D2 and prolactin receptor messenger ribonucleic acid expression by the polymerase chain reaction in human meningiomas. *Neurosurgery* 1996;38:367-75.
- Carroll RS, Zhang J, Black PM. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human meningiomas. *J Neurooncol* 1999;42:109-16.

- Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Black P. Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 1995;37:496-504.
- Cascino GD. Epilepsy and brain tumors: implications for treatment. *Epilepsia* 1990;31:37-44.
- Castillo B, Cawthorn S, Moppett J, Shere M, Norman M. Expression of prolactin receptor mRNA in oestrogen receptor positive breast cancers pre- and post-tamoxifen therapy. *Eur J Surg Oncol* 2004;30:515-9.
- Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detecting proliferating cells in microwave-processed formalin- fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168:357-63.
- Chiu S, Koos RD, Wise PM. Detection of prolactin receptor (PRL-R) mRNA in the rat hypothalamus and pituitary gland. *Endocrinology* 1992;130:1747-9.
- Chiu S, Wise PM. Prolactin receptor mRNA localization in the hypothalamus by in situ hybridization. *J Neuroendocrinol* 1994;6:191-9.
- Ciccarelli E, Razzore P, Gaia D, Todaro C, Longo A, Forni M, Ghè C, Camanni F, Muccioli G, Faccani G, Lanotte M. Hyperprolactinaemia and prolactin binding in benign intracranial tumors. *J Neurosurg* 2001;45:70-4.
- Colao A, Vitale G, Sarno AD, Spiezza S, Guerra E, Ciccarelli A, Lombardi G. Prolactin and prostate hypertrophy: a pilot observational, prospective, case-control study in men with prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2770-5.
- Cook DM. Long-term management of prolactinomas – use of long-acting dopamine agonists. *Rev Endocrinol Metab Dis* 2005;6:15-21.

- Coons SW, Johnson PC. Pathology of primary intracranial malignant neoplasm. In: Morantz RA, Walsh JW. (eds). Brain tumors: a comprehensive text. New York:Merrel Dekker:1994.p.45-108.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH, editors. The biochemical basis of neuropharmacology. 4<sup>th</sup> ed. New York:Oxford University Press;1982:p. 173-221.
- Coppenolle FV, Skryma R, Ouadid-Ahidouch H, Slomianny C, Roudbaraki M, Delcourt P, Dewailly E, Humez S, Crepin A, Gourdou I, Djiane J, Bonnal JL, Mauroy B, Prevarskaya N. Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K<sup>+</sup> channel activation. *Biochem J* 2004;377:569-78.
- Corenblum B, Fairadeau N, Shewchuk AB. Prolactin hypersecretion and short luteal phase defects. *Obstet Gynecol* 1976;47:486-8.
- Costello LC, Franklin RB. Testosterone and prolactin regulation of metabolic genes and citrate metabolism of prostate epithelial cells. *Horm Metab Res* 2002;38:417-24.
- Cowen PJ, Sargent PA. Changes in plasma prolactin during SSRI treatment: evidence for a delayed increase in 5-HT neurotransmission. *J Psychopharmacol* 1997;11:345-8.
- David SR, Taylor CC, Kinon BJ, Breier A. The effects of olanzapine, risperidone, and haloperidol on plasma prolactin levels in patients with schizophrenia. *Clin Ther* 2000;22:1085-96.
- Davis FG, Freelis S, Grutsch J, Barlas S, Brem S. Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patients' age and tumor histological type: an analysis based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data, 1973-1991. *J Neurosurg* 1998;88:1-10.
- DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med* 2001;344:114-23.

- Delgrange E, Trouillas J, Maiter D, Donckier J, Tourniaire J. Sex-related difference in the growth of prolactinomas: a clinical and proliferation marker study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2102-7.
- De Mello ES, Alves VAF. Manual de Imunoistoquímica. In: Alves VAF, editor. Marcadores de proliferação celular. São Paulo:Editora da Sociedade Brasileira de Patologia;1999:p. 182-94.
- Dervan PA, Magee HM, Buckley C, Carney DN. Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue. *Am J Clin Pathol* 1992;97:S21-8.
- DeVito WJ. Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and restraint stress. *Neuroendocrinology* 1988;47:284-9.
- DeVito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 1992;130:2549-56.
- Devost D, Boutin JM. Autoregulation of the rat prolactin gene in lactotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 1999;158:99-109.
- Diaz S, Seron-Ferre M, Cardenas H, Schiappacasse V, Brandeis A, Croxatto HB. Circadian variation of basal plasma prolactin, prolactin response to suckling, and length of amenorrhea in nursing women. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:946-55.
- Dohi K, Kraemer WJ, Mastro AM. Exercise increases prolactin-receptor expression on human lymphocytes. *J Appl Physiol* 2003;94:518-24.
- Ducret T, Boudina S, Sorin B, Vacher A, Gourdou I, Liguoro D, Guerin J, Bresson-Bepoldin L, Vacher P. Effects of prolactin on intracellular calcium concentrations and cell proliferation in human glioma cells. *Glia* 2002;38:200-14.

- Fahie-Wilson MN, Soule SG. Macroprolactinaemia: contribution to hyperprolactinaemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based on precipitation with polyethylene glycol. *Ann Clin Biochem* 1997;34:252-8.
- Finidori J, Kelly PA. Cytokine receptor signalling through two novel families of transducers molecules: Janus kinases and signal transducers and activators of transcription. *J Endocrinol* 1995;147:11-23.
- Fischberg DJ, Bancroft C. The D<sub>2</sub> receptor: blocked transcription in GH<sub>3</sub> cells and cellular pathways employed by D<sub>2A</sub> to regulate prolactin promoter activity. *Mol Cell Endocrinol* 1995;111:129-37.
- Flowers A. Brain tumors in the older person. *Cancer Control* 2000;7:523-538.
- Forsyth PA, Posner JB. Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients. *Neurology* 1993;43:1678-83.
- Frantz AG. Prolactin. *N Engl J Med* 1978;298:201-207.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000;80:1523-631.
- Garcia-Caballero T, Morel G, Gallego R, Fraga M, Pintos E, Gago D, Vonderhaar BK, Beiras A. Cellular distribution of prolactin receptors in human digestive tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1861-6.
- George SR, Watanabe M, Di Paolo T, Falardeau P, Labrie F, Seeman P. The functional state of the dopamine receptor in the anterior pituitary is in the high affinity form. *Endocrinology* 1985;117:690-7.
- Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistologic detection of tumor growth fraction (Ki-67) in formalin fixed and routinely processed tissue. *J Pathol*

1992;168:85-7.

- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-15.
- Gerdes J, Li L, Schueleter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad H. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the Cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*, 1991;138:867-73.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 1983;31:13-20.
- Ghnassia JP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Ann Pathol* 1996;16:241-6.
- Giles GG, McNeil JJ, Donnan G, Webley C, Steples MP, Ireland PD, Hurley SF, Salzberg M. Dietary factors and the risk of glioma in adults: results of a case-control study in Melbourne, Australia. *Int J Cancer* 1994;59:357-62.
- Girolami UD, Anthony DC, Frosch MP. The central nervous system. In: Cotran R, Kumar V, Robbins S, editors. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia:WB Saunders;1999:p. 1243-1357.
- Glick RP, Molteni A, Fors EM. Hormone binding in brain tumors. *Neurosurgery* 1983;13:513-9.
- Goffin V, Bernichtein S, Touraine P, Kelly PA. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr Rev* 2005;26:400-22.

- Goffin V, Kelly PA. Prolactin and growth hormone receptors. *Clin Endocrinol* 1996;45:247-55.
- Gomez F, Reyes FI, Faiman C. Nonpuerperal galactorrhea and hyperprolactinemia. Clinical findings, endocrine features and therapeutic responses in 56 cases. *Am J Med* 1977;62:648-60.
- Goupille O, Barnier JV, Guibert B, Paly J, Djiane J. Effect of prolactin on MAPK activation: negative regulatory role of the C-terminal part of the PRL receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159:133-46.
- Goupille O, Daniel N, Bignon C, Jovilet G, Djane J. Prolactin signal transduction to milk protein genes: carboxy-terminal part of the prolactin receptor and its tyrosine phosphorylation are not obligatory for JAK2 and STAT5 activation. *Mol Cell Endocrinol* 1997;127:155-69.
- Graem N, Helweg-Larsen K. Mitotic activity and delay in fixation of tumor tissue. The influence of delay in fixation on mitotic activity of a human osteogenic sarcome grown in a thymic nude mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1979;87:375-8.
- Greenwald P, Friedlander BR, Lawrence CE, Hearne T, Earle K. Diagnostic sensitivity bias – an epidemiologic explanation or an apparent brain tumor excess. *J Occup Med* 1981;23:690-4.
- Greer ME, Moraczewski T, Rakoff JS. Prevalence of hyperprolactinemia in anovulatory woman. *Obstet Gynecol* 1980;56:65-9.
- Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams BD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, Kornblum HI, Liu X, Wu H. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by Pten tumorsuppressor gene in vivo. *Science* 2001;294:2186-9.



- Grubb MR, Chakeres D, Malarkey WB. Patients with primary hypothyroidism presenting as prolactinomas. *Am J Med* 1987;83:765-9.
- Grzybicki DM, Moore SA. Implications of prognostic markers in brain tumors. *Clin Lab Med* 1999;19:833-47.
- Gurney JG, Smith MA, Bunin GR. CNS and miscellaneous intracranial and intraspinal neoplasms. In: Ries LA, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (Eds). *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States Seer Program 1975-1995*. National Cancer Institute, SEER Program, Bethesda MD 1999; pp 51-63. Online NII Pub. No.99-4649.
- Gutierrez MA, Molina JF, Jara LJ, Cuélcár ML, Garcia C, Gutiérrez-Ureña S, Gharavi A, Espinoza LR. Prolactin and systemic lupus erythematosus: prolactin secretion by SLE lymphocytes and proliferative (autocrine) activity. *Lupus* 1995;4:348-352.
- Hanson MW, Glantz MJ, Hoffman JM, Friedman AH, Burguer PC, Schold SC, Coleman RE. FDG-PET in the selection of brain lesions for biopsy. *J Comput Assist Tomogr* 1991;15:796-80.
- Hasunuma I, Toyoda F, Yamamoto K, Yamashita M, Kikuyama S. Localization of prolactin receptor in the newt brain. *Cell Tissue Res* 2005;320:477-85.
- Herman V, Fagini J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1427-33.
- Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Meningiomas and hormonal receptors. Immunohistochemical study in typical and non-typical tumors. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56:193-9.

- Horti J, Figg WD, Weinberger B, Kohler D, Sartor O. A phase II study of bromocriptine in patients with androgen-independent prostate cancer. *Oncol Rep* 1998; 5:893-6.
- Horwitz GA, Miklovsky I, Heaney AP, Ren S, Melmed S. Human pituitary tumor-transforming gene (PTTG1) motif suppresses prolactin expression. *Mol Endocrinol* 2003;17:600-9.
- Hsu DW, Efirid JT, Hedwey-Whyte ET. Progesterone and estrogen receptor in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 1997;86:113-20.
- Hu Z, Zhuang L, Dufau ML. Multiple and tissue-specific promoter control of gonadal and nongonadal prolactin receptor gene expression. *J Biol Chem* 1996;271:10242-6.
- Hurley SF, McNeil JJ, Donnan GA, Forbes A, Salzberg M, Giles GG. Tobacco smoking and alcohol consumption as risk factors for glioma: a case-control study in Melbourne, Australia. *J Epidemiol Community Health* 1996;50:422-6.
- Inskip PD, Tarone RE, Hatch EE, Wilcosky TC, Shapiro WR, Selker RG, Fine HA, Black PM, Loeffler JS, Linet MS. Cellular-telephone use and brain tumors. *N Engl J Med* 2001;344:79-86.
- Isik AZ, Guleki B, Zorlu CG, Ergin T, Gokmen O. Endocrinological and clinical analysis of hyperprolactinemic patients with and without ultrasonically diagnosed polycystic ovarian changes. *Gynecol Obstet Invest* 1997;43:183-5.
- Izumoto S, Suzuki T, Kinoshita M, Hashiba T, Kagawa N, Wada K, Fugimoto Y, Hashimoto N, Saitoh Y, Maruno M, Yoshimine T. Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in craniopharyngiomas: correlation with clinical and histologic features. *Surg Neurol* 2005;63:520-5.

- Janus TJ, Kim EE, Tilbury R, Bruner JM, Yung WK. Use of 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with primary malignant brain tumors. *Ann Neurol* 1993;33:540-8.
- Jimenez-Hakim E, el-Azouzi M, Black P. The effect of prolactin and bombesin on the growth of meningioma-derived cells in monolayer culture. *J Neurooncol* 1993;16:185-90.
- Johannesen TB, Langmark F, Lote K. Cause of death and long-term survival in patients with neuro-epithelial brain tumors: a population-based study. *Eur J Cancer* 2003;39:2355-63.
- Jones RL, Critchley HOD, Brooks J, Jabbour HN, McNeilly AS. Localization and temporal expression of prolactin receptor in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:258-62.
- Kaplan S, Novikov I, Modan B. Nutritional factors in the etiology of brain tumors: potential role for nitrosamines, fat and cholesterol. *Am J Epidemiol* 1997;146:832-41.
- Katznelson L, Klibanski A. Prolactin and its disorders. Chapter 15. In: Becker KL, editor. *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: J.B.Lippincott Company. 2001;p. 145-153.
- Katznelson L, Riskind PN, Saxe VC, Klibanski A. Prolactin pulsatile characteristics in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:761-4.
- Kelly PA, Bachelot A, Kedzia C, Hennighausen L, Ormandy CJ, Kopchick JJ, Binart N. The role of prolactin and growth hormone in mammary gland development. *Mol Cell Endocrinol* 2002;197:127-31.

- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Ederly M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991;12:235-51.
- Khalid H, Yasunaga A, Kishikawa M, Shibata S. Immunohistochemical expression of the estrogen receptor-related antigen (ER-D5) in human intracranial tumors. *Cancer* 1995;75:2571-8.
- Khoshyomn S, Lew S, DeMattia J, Singer EB, Penar PL. Brain tumor invasion rate measured in vitro does not correlate with Ki-67 expression. *J Neurooncol* 1999;45:111-6.
- Khurana S, Ranmal S, Ben-Jonathan N. Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology* 2000;141:4512-7.
- Kirby M, Zsarnovsky A, Belcher SM. Estrogen receptor expression in a human primitive neuroectodermal tumor cell line from the cerebral cortex: estrogen stimulates rapid ERK1/2 activation and receptor-dependent cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:753-8.
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW, editors. *Histological typing of tumours of the central nervous system*. 2<sup>nd</sup> ed. Germany:Springer-Verlag;1993:p. 1-51.
- Kleihues P, Cavenee WK, editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system*. Lyon: Iarc Press;2000.
- Kolodny J, Duhay R. Recurrent prolactinoma and meningioma following irradiation and bromocriptine treatment. *Am J Med* 1985;78:153-5.

- Konstantinidou AE, Korkolopoulou P, Mahera H, Kotsiakis X, Hranioti S, Eftychiadis C, Patsouris P. Hormone receptors in non-malignant meningiomas correlate with apoptosis, cell proliferation and recurrence-free survival. *Histopathology* 2003;43:280-90.
- Kreipe H, Zeidler R, Fischer L, Feist, H. Immunocytochemical assessment of cell proliferation. In: Holfstätter F, Knüchel R, Rüschoff J. Meeting Report - Cell Proliferation Assessment in Oncology. *Virchows Arch* 1995;427:323-41.
- Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P. Tumours of the nervous system. In: Graham DI, Lantos PL (eds). *Greenfield's Neuropathology*. London: Arnold:2002.p.767.
- Lee PA, Kelly MR, Wallin JD. Increased prolactin levels during reserpine treatment of hypertensive patients. *JAMA* 1976;235:2316-7.
- Leslie H, Courtney Bell PM, Hadden DR, McCance DR, Ellis PK, Sheridan B, Atkinson AB. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by simple polyethylene glycol precipitation method. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2743-6.
- Lin RS, Dischinger PC, Conde J, Farrel KP. Occupational exposure to electromagnetic fields and the occurrence of brain tumors. An analysis of possible associations. *J Occup Med* 1985;27:413-9.
- Llovera M, Pichard C, Bernichtein S, Jeay S, Touraine P, Kelly PA, Goffin M. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 2000;19:4695-705.

- Malayer JR, Gorski J. The role of estrogen receptor in modulation of chromatin conformation in the 5' flanking region of the rat prolactin gene. *Mol Cell Endocrinol* 1995;113:145-54.
- Mangurian LP, Jurjus AR, Walsh RJ. Prolactin receptor localization in the area postrema. *Brain Res* 1999;836:218-20.
- Marconi F, Parenti G. Radiation-induced cerebral meningiomas. Case reports. *J Neurosurg Sci* 1997;41:413-7.
- Markwalder TA, Markwalder RV, Zava DT. Estrogen and progestin receptors in meningiomas: clinicopathological correlations. *Clin Neuropharmacol* 1984;7:368-74.
- Martin TL, Kim W, Malarkey WB. The natural history of idiopathic hyperprolactinemia: a prospective analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:412-5.
- Mathews MB, Bernstein RM, Franze Jr BR, Garrels JI. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984;303:374-6.
- McCallum RW, Sowers JR, Hershman JM, Sturdevant RA. Metoclopramide stimulates prolactin secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:1148-52.
- McCormick CY, Yu C, Hobbs C, Hall PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology* 1993;22:543-7.
- 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.
- McGuire WL, Chammess GC, Fuqua SAW. The importance of normal and abnormal oestrogen receptor in breast cancer. *Cancer Surveys* 1992;14:31-40.

- McLaughlin JK, Malaker HS, Blot WJ, Malaker BK, Stone BJ, Weiner JA, Ericsson JL, Fraumeni Jr JF. Occupational risks for intracranial gliomas in Sweden. *J Natl Cancer Inst* 1987;78:253-7.
- Mehta D, Khatib R, Patel S. Carcinoma of the breast and meningioma. Association and management. *Cancer* 1983;51:1937-40.
- Meltzer HY. Treatment of schizophrenia and spectrum disorders: pharmacotherapy, psychosocial treatments and neurotransmitter interactions. *Biol Psychiatry* 1999;46:1321-7.
- Miller WR, Langdon SP. Steroid hormones and cancer: (III) Observations from human subjects. *Eur J Surg Oncol* 1997;23:163-83.
- Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibodies to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978;121:2228-34.
- Modan B, Baidatz D, Mart H, Steinitz R, Levin SG. Radiation-induced head and neck tumors. *Lancet* 1974;1:277-9.
- Molitch ME. Disorders of prolactin secretion. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:585-610.
- Molitch ME. Prolactin. In: Melmed S, editor. *The Pituitary*. 2<sup>nd</sup> ed. Boston: Blackwell Scientific Publication;2002:p. 136-86.
- Montine TJ, Vandersteenhoven JJ, Aguzzi A, Boyko OB, Dodge RK, Kerns BJ, Burger PC. Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 1994;34:674-8.

- Muccioli G, Ghe C, Faccani G, Lanotte M, Forni M, Ciccarelli E. Prolactin receptors in human meningiomas: characterization and biological role. *J Endocrinol* 1997;153:365-71.
- Murdoch FE, Byrne LM, Ariazi EA, Furlow JD, Meier DA, Gorski J. Estrogen receptor binding to DNA: affinity for nonpalindromic elements from rat prolactin gene. *Biochemistry* 1995;34:9144-50.
- Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Douglas D, Coutts A, Watson PH. Estrogen receptor variants and mutation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;62:363-72.
- Murray A, Evans G, Hunt J, Nurse P. The cell-division cycle. In: Alberts B, Bray D, Lewis JJ, Ralf M, Roberts K, Watson JD, editors. *Molecular Biology of the Cell*. 3<sup>rd</sup> ed. Londres:Garland Publishing Inc;1994.:p. 863-910.
- Nandi E, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci (PNAS)* 1995;92:3650-7.
- National Cancer Institute. *Cancer statistics review 1973-1988*. NCI, Bethesda. NII Publication no. 91-21789.
- Neglia JP, Meadows AT, Robison LL, Kim TH, Newton WA, Ruymann FB, Sather HN, Hammond GD. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 1991;325:1330-6.
- Nogueira CK. Fisiologia da secreção de prolactina. In Cukiert A, Liberman B, editors. *Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica*. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo:Lemos editorial;2002:p. 139-148.



- Nunley WC, Urban RJ, Kitchin JD, Bateman BG, Evans WS, Veldhuis JD. Dynamics of pulsatile prolactin release during the postpartum lactational period. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:287-93.
- Nystrom E, Leman J, Lundberg PA, Lindquist O, Hansson T, Bengtsson C, Rybo G, Lindstae G. Bone mineral content in normally menstruating women with hyperprolactinaemia. *Horm Res* 1988;29:214-7.
- Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E, Garcia-Ruiz JP. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002;190:51-63.
- Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 2005;25:1-7.
- O'Keane V, Meaney AM. Antipsychotic drugs: a new risk factor for osteoporosis in young women with schizophrenia? *J Clin Psychopharmacol* 2005;25:26-31.
- Oliveira MC, Moraes JT, Barros HM, Barbosa-Coutinho LM. Effect of estrogen and neuroleptics on prolactin secretion and immunoreactive prolactin cells. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:521-5.
- Olukoga AO, Kane JW. Macroprolactinaemia: validation and application of a polyethylene glycol precipitation test and clinical characterization of the condition. *Clin Endocrinol* 1999;51:119-26.
- Ormandy CJ, Hall RE, Manning DL, Robertson JFR, Blamey RW, Kelly PA, Nicholson RI, Sutherland RL. Coexpression and cross-regulation of the prolactin receptor and steroid hormone receptors in breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3692-9.

- Ozarda AT. Prolactin-secreting tumors. *J Surg Oncol* 1983;22:9-10.
- Peirce SK, Chen WY. Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human

- Preston-Martin S, Pogoda JM, Schlehofer B, Blettner M, Howe GR, Ryan P, Menegoz F, Giles GG, Rodvall Y, Choi NW, Little J, Arslan A. An international case-control study of adult glioma and meningioma: the role of head trauma. *Int J Epidemiol* 1998;27:579-86.
- Preston-Martin S, Thomas DC, Wright WE, Henderson BE. Noise trauma in the etiology of acoustic neuromas in men in Los Angeles County, 1978-1985. *Br J Cancer* 1989;59:783-6.
- Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: Evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990;160:93-102.
- Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Smith JS, McDermott MW. Techniques to assess the proliferative potential of brain tumors. *J Neurooncol* 2005;74:19-30.
- Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Ann Neurol* 1995;37:67-73.
- Raso GM, Meli R, Gualillo O, Pacilio M, Di Carlo R. Prolactin induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells. *J Neurochem* 1999;73:2272-7.
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 1992;12:4565-74.
- Rivera JL, Lal S, Ettigi P, Hontela S, Muller HF, Friesen HG. Effect of acute and chronic neuroleptic therapy on serum prolactin levels in man and women of different age groups. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1976;5:273-82.

- Romeo JH, Dombrowski R, Kwak YS, Fuehrer S, Aron DC. Hyperprolactinemia and verapamil: prevalence and potential association with hypogonadism in men. *Clin Endocrinol* 1996;45:571-5.
- Roser F, Samii M, Ostertag H, Bellinzona M. The Ki-67 proliferation antigen in meningiomas. Experience in 600 cases. Clinico-pathological study. *Acta Neurochir* 2004;146:37-44.
- Rubinstein AB, Louen D, Geier A, Reichenthal E, Gadoth N. Hormone receptors in initially excised versus recurrent intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 1994;81:184-7.
- Rudolph P, Parwaresch C. How do cells cycle? In: Holfstädter F, Knüchel R, Ruschoff J. Meeting Report - Cell Proliferation Assessment in Oncology. *Virchows Arch* 1995;427:323-41.
- Sagar SM, Israel MA. Primary and metastatic tumors of the nervous system. In: Kasper DL, Fauci A, Longo D, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, editors. *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 16<sup>th</sup>. NY:McGraw-Hill;2005;p. 2452.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 2005;353:811-22.
- Sant M, Van Der Sanden G, Capocaccia R, Eurocare Working Group. Survival rates for primary malignant brain tumors in Europe. *Eur J Cancer* 1998;34:2241-7.
- Santosh I, Rajshekhar V. Galactorrhea as the sole presenting symptom of a posterior third ventricular epidermoid cyst. *Surg Neurol* 2001;55:46-9.
- Schaller B, Rüegg SJ. Brain tumor and seizures: pathophysiology and its implications for treatment revisited. *Epilepsia* 2003;44:1223-32.

- Scheithauer BW, Sano TS, Kovacs KT, Young WF, Ryan N, Randall RV. The pituitary gland in pregnancy: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 69 cases. *Mayo Clin Proc* 1990;65:461-474.
- Schlechte J, El-Khoury G, Kathol M, Walkner L. Forearm and vertebral bone mineral density in treated and untreated hyperprolactinemic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:1021-6.
- Schlehofer B, Kunze S, Sachsenheimer W, Blettner M, Niehoff D, Wahrendorf J. Occupational risk factor for brain tumors: results from a population-based case-control study in Germany. *Cancer Causes Control* 1990;1:209-15.
- Schonk DM, Kuijpers HJH, Van Drunen E, Van Dalen CH, Geurts VAN, Kessel AHM, Verheijen R. Assignment of the genes(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Human Genet* 1989;83:297-9.
- Schrell U, Fahlbusch R, Adams E, Nomikos P, Reif M. Growth of cultured human cerebral meningiomas is inhibited by dopaminergic agents. Presence of high affinity dopamine-D1 receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1669-1671.
- Schwarting R. Little missed markers and Ki-67. *Lab Invest* 1993;68:597-9.
- Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, Van Noorden S, Price Y, Lane DP, Wright NA. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 1991;165:173-8.
- Shah R, Leavens M, Saman N. Galactorrhea, amenorrhea and hyperprolactinemia as manifestations of parasellar meningioma. *Arch Intern Med* 1980;140:1608-12.

- Shiu RPC, Elsholtz HP, Tanaka T, Friesen HG, Gout PW, Geer CT, Noble RL. Receptor-mediated mitogen activation of prolactin receptor in rat lymphoma cell line. *Endocrinology* 1983;113:159-65.
- Shivers BD, Harlan RE, Pfaff DW. A subset of neurons containing immunoreactive prolactin is a target for estrogen regulation of gene expression in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1989;49:23-7.
- Shome B, Parlow AF. Human pituitary prolactin (hPRL): entire linear amino acid sequence. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;45:1112-5.
- Sievertsen GD, Lim VS, Nakawatase C, Frohman LA. Metabolic clearance and secretion rates of human prolactin in normal subjects and patients with chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50:846-52.
- Sluijmer AV, Lappöhn RE. Clinical history and outcome of 59 patients with idiopathic hyperprolactinemia. *Fertil Steril* 1992;58:72-7
- Smith TP, McKenna TJ. Macroprolactinemia: contribution to hyper-prolactinemia in a general endocrine and gynaecological practice. *J Endocrinol Abstract* 1999;160:197.
- Steiner J, Cassar J, Mashiter K, Dawes I, Fraser TR, Breckenridge A. Effect of methyldopa on prolactin and growth hormone. *Br Med J* 1976;1:1186-8.
- Strojan P, Popovic M, Jereb B. Secondary intracranial meningiomas after high-dose cranial irradiation: report of five cases and review of the literature. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:65-73.
- Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of

macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. *Clin Chem* 2003;49:1504-9.

- Surawicz TS, McMarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. *Neurooncol* 1999;1:14-25.
- Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with a cell proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronised cells. *J Exp Med* 1981;154:1899-909.
- Tyson JE, Ito P, Guyda H, Friesen HG. Studies of prolactin in human pregnancy. *Am J Obst Gynecol* 1972;113:14-20.
- Tzika AA, Zarifi MK, Goumnerova L, Astrakas LG, Zurakowski D, Young-Poussaint T, Anthony DC, Scott M, Clack PM. Neuroimaging in pediatric brain tumors: Gd-DTPA-enhanced, hemodynamic, and diffusion MR imaging compared with MR spectroscopic imaging. *Am J Neuroradiol* 2002;23:322-33.
- Vallete-Kasics S, Moraqnge-Ramos I, Selim A, Gunzg B, Morange S, Enjalbert A, Martin PM, Jaquet P, Bruet T. Macroprolactinemia revisited: a study on 106 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:581-8.
- Vaquero J, Marcos ML, Martinez R, Bravo G. Estrogen and progesterone-receptor proteins in intracranial tumors. *Surg Neurol* 1983;19:11-3.
- Veldhuis JD, Johson ML. Operating characteristics of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in men: circadian, ultradian, and pulsatile release of prolactin and its temporal coupling with luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:116-23.

- Verheijn R, Kuijpers HJH, Van Driel R, Beck JLM, Van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FCS. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Science* 1988;92:123-30.
- Verheijn R, Kuijpers HJH, Van Driel R, Beck JLM, Van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FCS. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 1989;92:531-40.
- Verhelst & Abs J, Abs R. Hyperprolactinemia: pathophysiology and management. *Treat Endocrinol* 2003;2:23-32.
- Visakorpi T. Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *J Pathol* 1992;168:7-13.
- Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology* 1991;129:983-90.
- Vonderhaar BK. Prolactin involvement in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 1999;6:389-404.
- Wakimoto H, Aoyagi M, Nakayama T, Nagashima G, Yamamoto S, Tamaki M, Hirakawa K. Prognostic significance of Ki-67, labeling index obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. *Cancer* 1996;77:373-80.
- Walsh JP, Pullan PT. Hyperprolactinemia in males: a heterogeneous disorder. *Aust N Z J Med* 1997;27:385-90.



- Wand GS. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *The Endocrinologist* 2003;13:52-57.
- Wassen NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990;96:121-9.
- Wen PY, Fine HA, Black PM, Shrive DC, Alexander 3<sup>rd</sup> R, Loeffler JS. High-grade astrocytomas. *Neurol Clin* 1995;13:875-900.
- Wennbo H, Gebre-Medhin M, Gritli-Linde A, Ohlsson C, Isaksson OG, Tornell J. Activation of the prolactin receptor but not growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. *J Clin Invest* 1997;100:2744-51.
- Wernze H, Schmitz E. Plasma prolactin and prolactin release in liver cirrhosis. *Acta Hepatogastroenterol* 1997;24:97-101.
- Willert C, Spitzer C, Kusserow S, Runge U. Serum neuron-specific enolase, prolactin and creatine kinase after epileptic and psychogenic non-epileptic seizures. *Acta Neurol Scand* 2004;109:318-23.
- Worrel JA, Marken PA, Beckman SE, Ruehler VL. Atypical antipsychotic agents: a clinical review. *Am J Health Syst Pharm* 2000;57:238-55.
- Yu-Lee L. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* 2002;57:435-55.
- Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prelant TR, Bronstein MD, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:761-7.

- Zinger M, McFarland M, Ben-Jonathan N. Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:689-96.

**Hiperprolactinemia e expressão imunoistoquímica de prolactina intracelular e de receptor de prolactina em tumores primários do sistema nervoso central e relação dos achados com a replicação celular**

Carolina Garcia Soares Leães, Arthur Pereira Filho, Júlia F S Pereira Lima, Cristina Micheletto Dallago, Rafael Loch Batista, Lígia M Barbosa-Coutinho, Nelson Pires Ferreira, Miriam da Costa Oliveira

Departamento de Patologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Centro de Neuroendocrinologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre

Correspondência:

Miriam da Costa Oliveira

Rua Dona Mimi Moro, 40

90480-050 Porto Alegre – RS – Brasil

Fax: 05551-30618814

[mco@portoweb.com.br](mailto:mco@portoweb.com.br)

Palavras-chave: Prolactina, hiperprolactinemia, tumores do sistema nervoso central, receptor de prolactina, Ki-67, Mib 1.

## RESUMO

Introdução: Na literatura estão descritos alguns casos de associação entre hiperprolactinemia e tumores do sistema nervoso central (SNC). Todavia, o papel da prolactina (PRL) no SNC permanece incerto. Objetivo: Avaliar a presença de hiperprolactinemia, PRL intracelular (PRLi) e receptor de PRL (R-PRL) em tumores primários do SNC e sua relação com a replicação celular através da detecção do antígeno Ki-67. Desenho: estudo transversal prospectivo. Pacientes e Métodos: 82 pacientes consecutivos com tumores primários do SNC foram submetidos a um questionário clínico e coleta de sangue venoso para a dosagem sérica de PRL e TSH. A técnica imunoistoquímica foi utilizada para avaliar a presença de PRLi, de R-PRL e do antígeno Ki-67. Resultados: A PRL sérica variou de 2 a 70ng/mL, tendo sido detectada hiperprolactinemia em 25 casos (30,5%). Observou-se a presença de PRLi em 18 pacientes (21,9%), nos quais a PRL sérica variou de 2 a 32ng/mL. Verificou-se uma correlação positiva entre os níveis de PRL sérica e a presença de PRLi (teste t de *Student*,  $p=0,022$ ). O R-PRL foi detectado por imunoistoquímica em 32 casos (39%). A frequência de hiperprolactinemia, de PRLi e de R-PRL foi similar nos diversos tipos de tumores do SNC. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre o índice Ki-67 e os níveis séricos de PRL, a presença de hiperprolactinemia, de PRLi ou de R-PRL. Não houve diferença significativa entre o índice Ki-67 do material obtido na primeira cirurgia ou na reintervenção. Conclusão: Hiperprolactinemia e a presença intracelular de PRL e de R-PRL foram achados comuns nessa população de tumores do SNC, sugerindo um papel da PRL na gênese tumoral.

## INTRODUÇÃO

A prolactina (PRL) é detectável em vários sítios hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos no sistema nervoso central (SNC), e deriva de duas origens: síntese local e transporte através da circulação (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). A presença do receptor de PRL (R-PRL) foi demonstrada em diversas áreas do SNC, incluindo área póstrema circumventricular do tronco cerebral (Mangurian *et al.*, 1999), amígdala, plexo coróide, bulbo olfatório, núcleos supra-quiasmático, pré-óptico e hipotalâmico ventral (Hasunuma *et al.*, 2005). Destes, o local de maior concentração de R-PRL é o plexo coróide (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000). O papel da PRL no SNC é incerto, todavia, está descrito seu efeito mitogênico em astrócitos (De Vito *et al.*, 1992) e em culturas de células de meningioma (Jimenez-Hakim *et al.*, 1993; Muccioli *et al.*, 1997) e glioblastoma (Ducret *et al.*, 2002).

Estudos atuais observaram efeito proliferativo da PRL em células de câncer de mama (Vonderhaar, 1999; Llovera *et al.*, 2000; Ben-Jonathan *et al.*, 2002), linfócitos T (Viselli *et al.*, 1991), células de linfoma Nb2 (Shiu *et al.*, 1983) e condrócitos (Ogueta *et al.*, 2002). Além disso, observou-se associação entre hiperprolactinemia e tumores de mama (Nandi *et al.*, 1995; Wennbo *et al.*, 1997; Vonderhaar, 1999; Bhatavdekar *et al.*, 2000) e de próstata (Costello & Franklin, 2002). A presença de R-PRL foi detectada em tecido de câncer de mama (Bonnetere *et al.*, 1982; Vonderhaar *et al.*, 1999; Zinger *et al.*, 2003), de próstata (Peirce & Chen, 2001) e de cólon e reto (Bhatavdekar *et al.*, 1994).

Há poucos dados na literatura sobre a associação de tumores do SNC com hiperprolactinemia (Shah *et al.*, 1980; Kolodny & Diuhy, 1985; McCowen *et al.*, 1999; Santosh & Rajshehar, 2001), na maior parte como relato de casos. Ainda, a expressão de R-

PRL foi demonstrada em meningiomas (Carroll *et al.*, 1996; Muccioli *et al.*, 1997; Ciccareli *et al.*, 2001) e schwannomas (Ciccareli *et al.*, 2001).

Desse modo, para ampliar o conhecimento sobre o tema, avaliou-se a presença de hiperprolactinemia, de PRL intracelular (PRLi) e de R-PRL numa série expressiva de pacientes com tumores primários do SNC. Adicionalmente, essas variáveis foram relacionadas com a replicação celular, estimada através do antígeno Ki-67, detectado pelo anticorpo Mib-1.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

### **Pacientes**

Este é um estudo prospectivo transversal de 86 pacientes consecutivos com suspeita de tumores primários do SNC admitidos no Hospital São José do Complexo Hospitalar Santa Casa (Porto Alegre – RS / Brasil) para ressecção cirúrgica, no período entre outubro de 2003 e setembro de 2005. Todos foram submetidos a um questionário, com atenção especial às medicações em uso e a queixas pertinentes ao eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Quatro pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem diagnóstico anátomo-patológico de neoplasia metastática do SNC. O protocolo deste estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética institucional. Todos os pacientes foram incluídos no estudo mediante a assinatura de consentimento livre e esclarecido.

Dos 82 pacientes, 31 eram do sexo masculino (37,8%) e 51 do feminino (62,2%), com idade variando de 10 a 81 anos (média de 51,9 anos); 17 casos submetiam-se à reintervenção cirúrgica. Com relação ao diagnóstico histológico, os três subtipos mais

freqüentes foram meningioma (39 casos, 47,6%), glioblastoma (16 casos, 19,6%) e astrocitoma (8 casos, 9,8%).

## **Métodos**

As amostras de tecido tumoral foram fixadas em formalina tamponada a 10% e embebidas em parafina. Secções seriadas de 4 micrômetros foram obtidas para aplicação da coloração de hematoxilina eosina e da técnica de imunistoquímica. Para detectar a PRLi foi utilizado anticorpo policlonal anti-humano (DakoCytomation, EUA), pronto para uso; para o R-PRL, anticorpo primário monoclonal anti-humano (clone PRL02, Neomarkers, EUA), 1:100 e, para o Ki-67, anticorpo monoclonal anti-humano (clone Mib-1, DakoCytomation, Dinamarca), 1:300. Material obtido de prolactinomas foi utilizado como controle positivo. Controles negativos foram processados omitindo-se o anticorpo primário e substituindo-o por soro não imuno-reativo.

A positividade de PRL intracelular e de R-PRL foi considerada baseando-se na presença de uma célula inequivocamente marcada. O índice Ki-67 foi expresso como percentagem de núcleos marcados sobre um total de, no mínimo, 200 células (220 a 1300 células) contadas em campos microscópicos de maior concentração (20x). Apenas núcleos inequivocamente marcados foram considerados na contagem. Uma percentagem de 10 ou mais núcleos marcados foi considerada como positividade para o Ki-67.

No dia anterior ao procedimento cirúrgico, uma amostra de sangue venoso foi obtida para avaliação de PRL e TSH basais, por quimioluminescência. Os valores de referência utilizados foram, para TSH, de 0,3 a 5,0mU/mL, para PRL em homens de 2 a 17ng/mL e, em mulheres, de 3 a 29ng/mL.

## **Análise estatística**

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio-padrão e, na presença de assimetria, conforme Lang & Secic, 1997, utilizou-se mediana e amplitude interquartil. A comparação de quatro ou mais grupos quanto à presença de hiperprolactinemia e dos achados II foi realizada por análise de variância. A comparação entre dois grupos foi feita pelo teste *t* de *Student*. Todas as variáveis quantitativas receberam transformação logarítmica antes de testes estatísticos. Comparações entre dados categóricos foram realizadas pelo teste do Qui-quadrado e, quando necessário, pelo teste exato de Fisher. As correlações tiveram sua significância avaliada através do coeficiente de Spearman. O nível de significância estatística adotado foi de 5%. Os dados foram analisados no programa SPSS para Windows.

## **RESULTADOS**

Em relação às manifestações clínicas, cefaléia esteve presente em 63,4% dos casos, monoparestesias ou hemiparestesias em 39%, tontura e/ou vertigem em 29,2%, diminuição do sensorio em 26,8% e crises convulsivas em 20,7%. A concentração sérica da PRL variou de 2 a 70ng/mL, estando elevada em 25 casos (30,5%), sendo 15 homens (variando de 18 a 46ng/mL) e 10 mulheres (variando de 32 a 70ng/mL). A proporção de hiperprolactinemia nos homens foi de 48,4%, e nas mulheres de 19,6%. A Tabela 1 discrimina a concentração sérica de PRL e os achados imunistoquímicos de acordo com o tipo histológico tumoral nos casos de hiperprolactinemia. Observou-se hiperprolactinemia em 3/4 schwannomas (75,0%), 7/16 glioblastomas (43,7%) e 3/8 astrocitomas (37,5%). Todavia, não foi



observada diferença estatisticamente significativa nos níveis da prolactina sérica e na frequência de hiperprolactinemia entre os diferentes tipos tumorais (teste exato de Fisher,  $p=0,26$ ).

PRLi (Figura 1) foi detectada em 18 pacientes (21,9%), nos quais a PRL sérica variou de 2 a 32ng/mL (Tabela 2). Observou-se, em dados logaritmicamente transformados, correlação positiva entre a PRL sérica e a presença intracelular de PRL (teste *t* de *Student*,  $p=0,022$ ).

Em relação ao R-PRL, a análise imunoistoquímica detectou sua presença em 32 casos (39,0%). As frequências de hiperprolactinemia e PRLi positiva nessa população com R-PRL positivo foram de 28,1 e 21,8%, respectivamente. A Tabela 3 resume os resultados de hiperprolactinemia, PRLi e R-PRL nos diferentes tipos histológicos de tumores do SNC. A Figura 1 ilustra a presença imunoistoquímica do R-PRL.

Sobre a replicação celular, não se observou correlação entre o valor do Ki-67 ou sua positividade com os níveis de PRL sérica, a presença de hiperprolactinemia, de PRL intracelular, de R-PRL (Tabela 4) ou de recidiva tumoral nos pacientes com tumores primários do SNC.

## DISCUSSÃO

Nesta série, os subtipos tumorais mais frequentemente observados foram o meningioma e tumores de tecido neuroepitelial (glioblastomas e astrocitomas), em desacordo com a literatura atual, que descreve a frequência de gliomas em torno de 50 a 80% dos tumores primários sintomáticos do SNC, e de meningiomas em 25 a 30% dos mesmos (Sagar *et al.*, 2005). Ainda, foi verificada uma predominância do sexo feminino na

amostra, provavelmente refletindo a maior prevalência de meningiomas, sabidamente mais comuns em mulheres (Lantos *et al.*, 2002). Quanto à faixa etária, observou-se uma média de idade de 51 anos, em concordância com a literatura, que relata um pico de incidência dos tumores primários do SNC em torno dos 50 anos de idade (Radhakrishnan *et al.*, 1995; Flowers *et al.*, 2000).

As manifestações clínicas se apresentaram de acordo com o esperado: cefaléia em mais de 50% dos casos de tumores cerebrais (DeAngelis, 2001; Pfund *et al.*, 1999) e crises convulsivas na apresentação na faixa de 18 a 45% dos casos (Cascino, 1990; Schaller & Rüegg, 2003).

A relação entre PRL e tumores do SNC chama atenção desde 1980, quando os primeiros relatos de casos de hiperprolactinemia associada a meningiomas foram descritos (Shah *et al.*, em 1980; Kolodny *et al.*, 1985). Mais recentemente, foram publicados um caso de hiperprolactinemia acentuada (1440ng/dL) associada a gangliocitoma com imunistoquímica positiva para PRL (McCowen *et al.*, 1999) e a associação de hiperprolactinemia e cisto epidermóide de terceiro ventrículo (Santosh *et al.*, 2001). Nos estudos supracitados não há menção de exclusão de causas fisiológicas, farmacológicas ou patológicas outras que explicassem a alteração da PRL. Em nosso estudo, no qual esse cuidado foi observado, hiperprolactinemia foi achado comum, ocorrendo em 30% da série, em 7 subtipos tumorais. A frequência de detecção em 23% dos meningiomas e em três quartos dos Schwannomas é similar a achados prévios de 27,3% dos meningiomas e 61,5% dos Schwannomas (Cicareli *et al.*, 2001). No trabalho atual, os maiores valores de PRL foram observados em astrocitomas. Não há relatos na literatura de níveis elevados de PRL em astrocitomas.

A proporção de hiperprolactinemia foi duas vezes maior nos homens que nas mulheres. Este achado chama a atenção, uma vez que, na população, hiperprolactinemia é mais comum em mulheres, afetando 15-20% daquelas com irregularidade menstrual (Greer *et al.*, 1980), 30-40% das com infertilidade (Prathibha *et al.*, 1994) e apenas 1 a 2% dos homens com disfunção erétil e/ou diminuição da libido (Akpunonu *et al.*, 1994).

Observou-se a presença intracelular de PRL em 21% da série, em 7 subtipos tumorais. Do conhecimento dos autores, não há na literatura atual dados sobre o achado imunoistoquímico de PRL intracelular nos tumores do SNC de origem extra-hipofisária. Mais interessante ainda é o achado de correlação positiva entre os níveis de PRL sérica e a presença de PRL intracelular.

A presença do R-PRL foi observada freqüentemente nos pacientes com tumores primários do SNC (39,0%), também em vários subtipos tumorais. Achados similares foram descritos anteriormente, demonstrando positividade de R-PRL em 45,4 (Cicarelli *et al.*, 2001) e 61,7% dos meningiomas (Muccioli *et al.*, 1997), e 69,2% dos schwannomas (Cicarelli *et al.*, 2001). Em nosso estudo, bem como no de Ciccarelli e colaboradores não se observou correlação entre a positividade do R-PRL e a ocorrência de hiperprolactinemia (Cicarelli *et al.*, 2001).

O índice Ki-67 tem se mostrado um marcador acurado da proliferação celular em tumores do SNC (Petrowsky *et al.*, 2001). Todavia, o impacto prognóstico desse marcador na evolução dos tumores do SNC ainda não é de consenso. No estudo atual, não foi observada diferença estatisticamente significativa do índice Ki-67 entre os principais tipos histológicos tumorais e os demais marcadores imunoistoquímicos utilizados. Do mesmo modo, Bredel e colaboradores não evidenciaram diferença significativa do índice Ki-67 entre os tipos histológicos de tumores do SNC (Bredel *et al.*, 2002). Além disso, também

não se observou diferença estatisticamente significativa no índice Ki-67 entre os pacientes submetidos ou não à reintervenção cirúrgica. Tal achado corrobora os de ausência de correlação do índice Ki-67 com sobrevida (Bouvier-Labit *et al.*, 1998; Grzybicki & Moore, 1999; Roser *et al.*, 2004) e grau de invasão tumoral (Khoshyomn *et al.*, 1999) em tumores do SNC. Em contrapartida, alguns estudos evidenciaram correlação positiva entre o índice Ki-67 e invasão tumoral em adenomas hipofisários (Pizarro *et al.*, 2004), menor tempo de sobrevida em gliomas (Montine *et al.*, 1994; Wakimoto *et al.*, 1996) e maior taxa de recidiva em craniofaringiomas (Izumoto *et al.*, 2005). Ao contrário dos demais autores supracitados, Bredel e colaboradores demonstraram relação positiva entre alta expressão de Ki-67 e maior tempo de sobrevida em glioblastomas (Bredel *et al.*, 2002).

Em conclusão, é relevante a presença de hiperprolactinemia desassociada a fatores etiológicos habituais em tumores do SNC. É igualmente relevante a presença de PRL intracelular e do R-PRL nesses tumores. A análise conjunta das variáveis hiperprolactinemia, PRL intracelular e R-PRL mostrou concomitância de duas das mesmas em inúmeros casos e, por duas vezes, a coexistência de todas. Esta constatação reforça a sugestão do papel modulador da PRL, de intensidade a ser explorada, no desenvolvimento dos tumores primários do SNC, num contexto em que estudos experimentais já demonstraram efeito mitogênico da PRL em células de meningiomas (Jimenez-Hakime *et al.*, 1993), de gliomas (Raso *et al.*, 1999; Ducret *et al.*, 2002) e de glioblastomas (Ducret *et al.*, 2002). A sugestão se mantém numa esfera de ausência de relação com a replicação celular, uma vez que a detecção do antígeno Ki-67 reflete a proporção de células que entram no ciclo celular para se dividirem, não necessariamente indicando a velocidade de progressão através do mesmo, nem a taxa de crescimento tumoral. Assim, o espectro de

participação da PRL no contexto das neoplasias pode se situar em um de vários papéis permissivos ou estimuladores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akpunonu BE, Mutgi AB, Federman DJ, York J, Woldenberg LS. Routine prolactin measurement is not necessary in initial evaluation of male impotence. *J Gen Inter Med* 1994;9:336-8.
- Ben-Jonathan N, Karen L, Molly M, Zinger M. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:245-9.
- Ben-Jonathan N, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev* 1996;17:639-69.
- Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah NG, Vora HH, Suthar TP, Ghosh N, Chikhlikar PR, Trivedi TI. Prolactin as a local growth promoter in patients with breast cancer: GCRI experience. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:540-7.
- Bhatavdekar JM, Vora H, Balar D, Patel D, Shah N, Karelia N, Chiklikar P, Ghosh N, Dave R. Interrelationship of prolactin and its receptor in carcinoma of the colon and rectum: a preliminary report. *J Surg Oncol* 1994;55:246-9.
- Bonnetterre J, Peyrat JP, Vandewalle B, Beuscart R, Vie MC, Cappelaere P. Prolactin receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982;18:1157-62.
- Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C, Gambarelli D, Dufour H, Figarella BD. Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24:381-8.
- Bredel M, Piribauer M, Marosi C, Birner P, Gatterbauer B, Fischer I, Ströbel T, Rossler K, Budke H, Hainfellner A. High expression of DNA topoisomerase II $\alpha$  and Ki-67

antigen is associated with prolonged survival in glioblastoma patients. *Eur J Cancer* 2002;38:1343-7.

- Carroll RS, Schrell UM, Zhang J, Dashner K, Nomikos P, Fahlbusch R, Black PM. Dopamine D1, dopamine D2 and prolactin receptor messenger ribonucleic acid expression by the polymerase chain reaction in human meningiomas. *Neurosurgery* 1996;38:367-75.
- Cascino GD. Epilepsy and brain tumors: implications for treatment. *Epilepsia* 1990;31:37-44.
- Ciccarelli E, Razzore P, Gaia D, Todaro C, LOngo A, Forni M, Ghê C, Camanni F, Muccioli G, Faccani G, Lanotte M. Hyperprolactinaemia and prolactin binding in benign intracranial tumors. *J Neurosurg* 2001;45:70-4.
- Costello LC, Franklin RB. Testosterone and prolactin regulation of metabolic genes and citrate metabolism of prostate epithelial cells. *Horm Metab Res* 2002;38:417-24.
- DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med* 2001;344:114-23.
- DeVito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 1992;130:2549-56.
- Ducret T, Boudina S, Sorin B, Vacher A, Gourdou I, Liguoro D, Guerin J, Bresson-Bepoldin L, Vacher P. Effects of prolactin on intracellular calcium concentrations and cell proliferation in human glioma cells. *Glia* 2002;38:200-14.
- Flowers A. Brain tumors in the older person. *Cancer Control* 2000;7:523-538.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000;80:1523-631.

- Greer ME, Moraczewski T, Rakoff JS. Prevalence of hyperprolactinemia in anovulatory woman. *Obstet Gynecol* 1980;56:65-9.
- Grzybicki DM, Moore SA. Implications of prognostic markers in brain tumors. *Clin Lab Med* 1999;19:833-47.
- Hasunuma I, Toyoda F, Yamamoto K, Yamashita M, Kikuyama S. Localization of prolactin receptor in the newt brain. *Cell Tissue Res* 2005;320:477-85.
- Izumoto S, Suzuki T, Kinoshita M, Hashiba T, Kagawa N, Wada K, Fugimoto Y, Hashimoto N, Saitoh Y, Maruno M, Yoshimine T. Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in craniopharyngiomas: correlation with clinical and histologic features. *Surg Neurol* 2005;63:520-5.
- Jimenez-Hakim E, el-Azouzi M, Black P. The effect of prolactin and bombesin on the growth of meningioma-derived cells in monolayer culture. *J Neurooncol* 1993;16:185-90.
- Khoshyomn S, Lew S, DeMattia J, Singer EB, Penar PL. Brain tumor invasion rate measured in vitro does not correlate with Ki-67 expression. *J Neurooncol* 1999;45:111-6.
- Kolodny J, Duihy R. Recurrent prolactinoma and meningioma following irradiation and bromocriptine treatment. *Am J Med* 1985;78:153-5.
- Lang TA, Secic M. How to report statistic in medicine. Philadelphia: American College of Physicians:1997.p.367.
- Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P. Tumours of the nervous system. In: Graham DI, Lantos PL (eds). *Greenfield's Neuropathology*. London: Arnold:2002.p.767.



- Llovera M, Pichard C, Bernichtein S, Jeay S, Touraine P, Kelly PA, Goffin M. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 2000;19:4695-705.
- Mangurian LP, Jurjus AR, Walsh RJ. Prolactin receptor localization in the area postrema. *Brain Res* 1999;836:218-20.
- McCowen K, Glickman J, Black P, Zervas N, Lidov H, Garber J. Gangliocitoma masquerading as a prolactinoma. Case report. *J Neurosurg* 1999;91:490-5.
- Montine TJ, Vandersteenhoven JJ, Aguzzi A, Boyko OB, Dodge RK, Kerns BJ, Burger PC. Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 1994;34:674-8.
- Muccioli G, Ghe C, Faccani G, Lanotte M, Forni M, Ciccarelli E. Prolactin receptors in human meningiomas: characterization and biological role. *J Endocrinol* 1997;153:365-71.
- Nandi E, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci (PNAS)* 1995;92:3650-7.
- Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E, Garcia-Ruiz JP. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002;190:51-63.
- Peirce SK, Chen WY. Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR. *J Endocrinol* 2001;171:R1-R4.

- Petrowsky H, Sturm I, Graubitz O, Kooby A, Staib-Sebler E, Gog C, Köhne CH, Hillebrand T, Daniel PT, Fong Y, Lorenz M. Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases. *EJSO* 2001;27:80-87.
- Pfund Z, Szapáry L, Jászberényi O, Nagy F, Czopf J. Headache in intracranial tumors. *Cephalgia* 1999;19:787-90.
- Pizarro CB, Oliveira MC, Coutinho LB, Ferreira NP. Measurement of Ki-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MiB-1 monoclonal antibody. *Braz J Medical Biolog Res* 2004;37:235-43.
- Prathibha D, Govardhani M, Krishna PT. Prolactin levels in infertility and bromocriptine therapy in hyperprolactinemia. *J Indian Med Assoc* 1994;92:397-9.
- Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Ann Neurol* 1995;37:67-73.
- Raso GM, Meli R, Gualillo O, Pacilio M, Di Carlo R. Prolactin induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells. *J Neurochem* 1999;73:2272-7.
- Roser F, Samii M, Ostertag H, Bellinzona M. The Ki-67 proliferation antigen in meningiomas. Experience in 600 cases. Clinico-pathological study. *Acta Neurochir* 2004;146:37-44.
- Sagar SM, Israel MA. Primary and metastatic tumors of the nervous system. In: Kasper DL, Fauci A, Longo D, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, editors. *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 16<sup>th</sup>. NY:McGraw-Hill;2005:p. 2452.
- Santosh I, Rajshekhar V. Galatorrhea as the sole presenting symptom of a posterior third ventricular epidermoid cyst. *Surg Neurol* 2001;55:46-9.

- Schaller B, Rüegg SJ. Brain tumor and seizures: pathophysiology and its implications for treatment revisited. *Epilepsia* 2003;44:1223-32.
- Shah R, Leavens M, Saman N. Galactorrhea, amenorrhea and hyperprolactinemia as manifestations of parasellar meningioma. *Arch Intern Med* 1980;140:1608-12.
- Shiu RPC, Elsholtz HP, Tanaka T, Friesen HG, Gout PW, Geer CT, Noble RL. Receptor-mediated mitogen activation of prolactin receptor in rat lymphoma cell line. *Endocrinology* 1983;113:159-65.
- Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology* 1991;129:983-90.
- Vonderhaar BK. Prolactin involvement in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 1999;6:389-404.
- Wakimoto H, Aoyagi M, Nakayama T, Nagashima G, Yamamoto S, Tamaki M, Hirakawa K. Prognostic significance of Ki-67, labeling index obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. *Cancer* 1996;77:373-80.
- Wennbo H, Gebre-Medhin M, Gritli-Linde A, Ohlsson C, Isaksson OG, Tornell J. Activation of the prolactin receptor but not growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. *J Clin Invest* 1997;100:2744-51.
- Zinger M, McFarland M, Ben-Jonathan N. Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:689-96.

## APÊNDICES

Tabela 1. Diagnóstico anátomo-patológico, prolactina sérica (PRL), prolactina intracelular (PRLi), receptor de prolactina (R-PRL) e antígeno Ki-67 dos casos de hiperprolactinemia em tumores primários do SNC

Caso	Idade (anos)	sexo	Anátomo-patológico	PRL (ng/mL)	PRLi	R-PRL	Ki-67 (%)
1	56	M	Glioblastoma	26	positivo	negativo	8
2	56	F	Meningioma	32	negativo	negativo	3
3	66	F	Glioblastoma	32	positivo	positivo	20
4	20	F	Astrocitoma	61	negativo	negativo	5
5	41	F	Meningioma	31	negativo	negativo	3
6	60	M	Neurinoma de Acústico	46	negativo	negativo	3
7	46	F	Meningioma	44	negativo	positivo	13
8	68	M	Glioblastoma	32	negativo	positivo	20
9	50	M	Schwannoma	19	negativo	negativo	3
10	18	M	Papiloma plexo coróide	40	negativo	positivo	20
11	62	M	Glioblastoma	25	negativo	positivo	30
12	71	M	Schwannoma	27	negativo	negativo	2
13	31	F	Astrocitoma	70	negativo	negativo	15
14	34	M	Glioblastoma	25	negativo	positivo	4
15	59	M	Astrocitoma	18	negativo	positivo	4

16	49	F	Meningioma	41	negativo	negativo	3
17	65	F	Meningioma	68	negativo	negativo	4
18	33	M	Glioblastoma	20	negativo	negativo	40
19	46	M	Meningioma	28	positivo	positivo	20
20	30	M	Schwannoma	18	positivo	negativo	10
21	63	F	Meningioma	50	negativo	negativo	35
22	70	M	Meningioma	20	negativo	negativo	7
23	77	M	Oligodendroglioma	30	positivo	negativo	40
24	64	F	Meningioma	47	negativo	positivo	6
25	36	M	Glioblastoma	27	negativo	negativo	3

---

Tabela 2. Diagnóstico anátomo-patológico, níveis séricos de prolactina (PRL), expressividade do receptor de prolactina (R-PRL) e do antígeno Ki-67 em pacientes com II positiva para PRL intracelular

Caso	Idade	Sexo	Anátomo-patológico	PRL (ng/mL)	R-PRL	Ki-67 (%)
1	56	M	Glioblastoma	<b>26</b>	Negativo	8
2	36	F	Meningioma	2	Negativo	10
3	62	F	Cordoma	14	Negativo	5
4	66	F	Glioblastoma	<b>32</b>	Positivo	20
5	51	M	Meningioma	7	Positivo	2
6	10	F	Astrocitoma	12	Negativo	2
7	35	M	Hemangioma	11	Negativo	20
8	72	F	Meningioma	6	Positivo	20
9	74	F	Meningioma	4	Negativo	7
10	46	M	Meningioma	<b>28</b>	Positivo	20
11	41	M	Astrocitoma	16	Positivo	3
12	62	F	Glioblastoma	7	Negativo	10
13	30	M	Schwannoma	<b>18</b>	Negativo	10
14	77	M	Oligodendroglioma	<b>30</b>	Negativo	40
15	34	M	Oligodendroglioma	6	Positivo	70
16	54	M	Schwannoma	7	Negativo	3
17	37	F	Meningioma	17	Positivo	5
18	53	M	Oligodendroglioma	11	Negativo	30

Em negrito os casos de hiperprolactinemia

Tabela 3. Presença de PRL intracelular (PRLi), de receptor de PRL (R-PRL) e de hiperprolactinemia nos diferentes tipos histológicos de tumores primários do SNC

Tipo Histológico (n)	Hiperprolactinemia n (%)	PRLi + n (%)	R-PRL + n (%)	R-PRL + e PRLi + n (%)
Meningioma (39)	9 (23,0)	6 (15,3)	18 (46,1)	4 (10,2)
Glioblastoma (16)	7 (43,7)	3 (18,7)	7 (43,7)	1 (6,2)
Astrocitoma (8)	3 (37,5)	2 (25,0)	3 (37,5)	1 (12,5)
Oligodendroglioma (5)	1 (20,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	1 (20,0)
Schwannoma (4)	3 (75,0)	2 (50,0)	0 (0)	0 (0)
Outros (10)	2 (20,0)	2 (20,0)	2 (20,0)	0 (0)
Total	25	18	32	7
p *	0,26	0,18	0,31	0,22

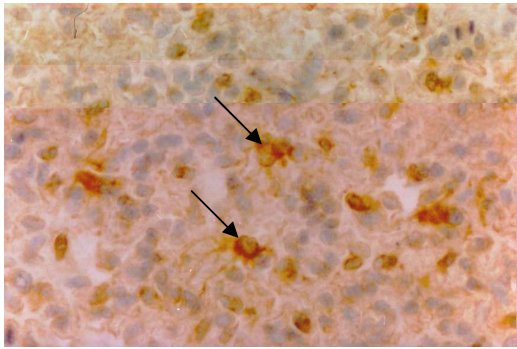
\* Relativo à diferença de frequência de cada variável em cada tipo celular (teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário)

Tabela 4. Relação entre índice Ki-67, hiperprolactinemia, PRL intracelular (PRLi) e receptor de prolactina (R-PRL) em pacientes com tumores primários do SNC

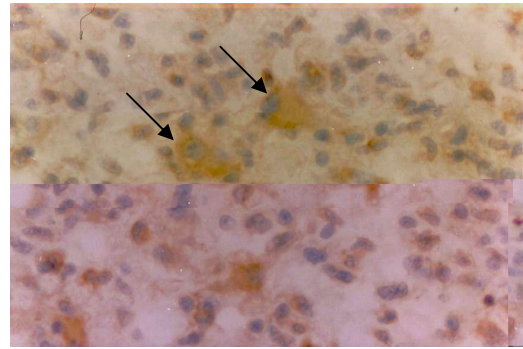
Índice Ki-67 (n)	Hiperprolactinemia n (%)	PRLi + n (%)	R-PRL + n (%)	PRLi + e R-PRL + n (%)
Negativo (44)	18 (72,0)	8 (44,4)	16 (50,0)	3 (42,9)
Positivo (38)	7 (28,0)	10 (55,6)	16 (50,0)	4 (57,1)
Total	25	18	32	7
p*	0,16	0,61	0,52	0,41

\* Relativo à diferença de frequência de cada variável nos casos positivos ou negativos para Ki-67 (teste *t* de Student)

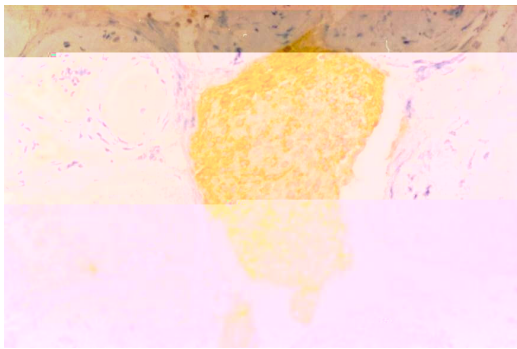




1a



1b



1c

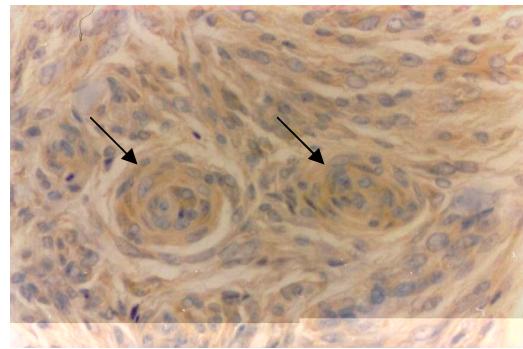


Figura 1.

1a. Caso 311897: glioblastoma mostrando positividade nas células neoplásicas mais diferenciadas (astrocíticas) para R-PRL (setas) (obj. 40x).

1b. Caso 311897: positividade para R-PRL na superfície das células neoplásicas mais diferenciadas de um glioblastoma (setas) (obj. 40x).

1c. Caso 325421: meningioma com positividade para R-PRL unicamente nas células meningoteliais (obj. 20x).

1d. Caso 303991: meningioma com positividade para PRLi nas células meningoteliais, caracteristicamente situadas nos verticilos (setas) (obj. 40x).

**Hyperprolactinemia and immunohistochemical expression of intracellular prolactin and prolactin-receptor in primary central nervous system tumors, and its relationship with cellular replication**

Carolina Garcia Soares Leães, Arthur Pereira Filho, Júlia F S Pereira Lima, Cristina Micheletto Dallago, Rafael Loch Batista, Lígia M Barbosa-Coutinho, Nelson Pires Ferreira, Miriam da Costa Oliveira.

Department of Pathology of Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre  
Center of Neuroendocrinology – Complexo Hospitalar Santa Casa of Porto Alegre/RS

Correspondence:

Miriam da Costa Oliveira

Rua Dona Mimi Moro, 40

90480-050 Porto Alegre – RS – Brazil

Fax: 055 51 3061-8814

[mco@portoweb.com.br](mailto:mco@portoweb.com.br)

Key-words: Prolactin, hyperprolactinemia, central nervous system tumor, prolactin-receptor, Ki-67, Mib 1.

## SUMMARY

**Background:** The association between hyperprolactinemia and central nervous system (CNS) tumors has been described in a few cases in the literature. However, the role of prolactin (PRL) in the CNS remains uncertain. **Objective:** To evaluate the presence of hyperprolactinemia, intracellular prolactin (ICP) and prolactin receptor (PRL-R) in primary CNS tumors, and its relationship with cellular replication, through Ki-67 antigen. **Design:** prospective cross-sectional study. **Patients and Methods:** 82 consecutive patients with primary CNS tumor were submitted to a questionnaire and venous blood sample were obtained for measurement of serum PRL and TSH. Immunohistochemical analyses were performed to evaluate the presence of ICP, PRL-R and Ki-67. **Results:** Serum PRL levels ranged from 2 to 70n/ml, and hyperprolactinemia was detected in 25 cases (30,5%). ICP was detected in 18 patients (21,9%), in which PRL ranged from 2 to 32ng/mL. A positive correlation was verified between PRL levels and the presence of ICP (Student's *t* test,  $p=0,022$ ). The PRL-R was observed immunohistochemically in 32 cases (39%). The frequencies of hyperprolactinemia, ICP and PRL-R were similar between the several histological types of CNS tumors. There was no statistically difference between Ki-67 index and serum PRL levels, presence of hyperprolactinemia, ICP or PRL-R. There was no difference between Ki-67 index from sample of the first surgery or reintervention. **Conclusion:** Hyperprolactinemia, intracellular presence of PRL and PRL-R were common findings in this population, suggesting a role for PRL in CNS tumor genesis.

## BACKGROUND

Prolactin (PRL) is detectable in many hypothalamic and extra-hypothalamic sites in the central nervous system (CNS), and it arises from two sources: local synthesis and transport from the blood circulation (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). The presence of PRL receptor (PRL-R) was demonstrated in several areas of the CNS, including circumventricular area postrema (Mangurian *et al.*, 1999) of brainstem, amygdale, choroid plexus, olfactory bulb, supraquiasmatic, preoptic and ventral hypothalamic nuclei (Hasunuma *et al.*, 2005). Of these, the densest concentration of PRL-R is observed in choroid plexus (Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2000). The role of PRL in the CNS is uncertain, although its mitogenic activity in astrocytes (DeVito *et al.*, 1992) and its proliferative effect in meningioma (Jimenez-Hakim *et al.*, 1993; Muccioli *et al.*, 1997) and glioblastoma (Ducret *et al.*, 2002) cultured-cells has previous been described.

Data from current literature showed the proliferative effect of PRL in breast cancer cells (Vonderhaar, 1999; Llovera *et al.*, 2000; Ben-Jonathan *et al.*, 2002), T lymphocytes (Viselli *et al.*, 1991), Nb2 lymphoma cells (Shiu *et al.*, 1983) and chondrocytes (Ogueta *et al.*, 2002). Moreover, hyperprolactinemia was associated with breast (Nandi *et al.*, 1995; Wennbo *et al.*, 1997; Vonderhaar, 1999; Bhatavdekar *et al.*, 2000) and prostate (Costello & Franklin, 2002) tumors. The presence of PRL-R was detected in breast (Bonneterre *et al.*, 1982; Vonderhaar *et al.*, 1999; Zinger *et al.*, 2003), prostate (Peirce & Chen, 2001) and colorectal (Bhatavdekar *et al.*, 1994) cancer tissue.

There are few cases in the literature of CNS tumors associated with hyperprolactinemia (Shah *et al.*, 1980; Kolodny & Diuhy, 1985; McCowen *et al.*, 1999; Santosh & Rajshekhar,

2001). Besides, PRL-R expression was demonstrated in meningiomas (Carroll *et al.*, 1996; Muccioli *et al.*, 1997; Ciccareli *et al.*, 2001) and schwannomas (Ciccareli *et al.*, 2001).

In this way, to enhance the knowledge about this issue, the presence of hyperprolactinemia, intracellular PRL (ICP) and PRL-R were evaluated in an expressive series of patients with primary CNS tumors. In addition, these variables were related with cellular replication, estimated through Ki-67 antigen, detected by Mib-1 antibody.

## METHODS

### Patients

This is a prospective study of 86 consecutive cases of suspected primary CNS tumors presenting at São José Hospital of Complexo Hospitalar Santa Casa (Porto Alegre, Brazil) for surgical resection between October 2003 and September 2005. A questionnaire was applied to all of them, with special attention to medications and gonadal axis. Four patients further diagnosed as secondary CNS tumor were excluded from the study. The research protocol used in this study was reviewed and approved by the Institutional Ethic Committee. All patients were enrolled after a written informed consent had been obtained.

Of the 82 patients, there were 31 males (37,8%) and 51 females (62,2%), their age ranged from 10 to 81 years (median of 51,9 years); 17 cases were being submitted to reintervention. About histological diagnosis, the three most frequent subtypes were meningioma (39 cases, 47,6%), glioblastoma (16 cases, 19,6%) and astrocytoma (8 cases, 9,8%).

## **Methods**

Samples of tumoral tissue were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Serial 4- $\mu$ m sections were obtained for staining with hematoxylin and eosin and immunohistochemistry. For the detection of intracellular PRL, it was used a polyclonal anti-human antibody (DakoCytomation, Carpinteria, USA), ready-to-use; for PRL-R, a primary monoclonal anti-human antibody (clone PRL02, Neomarkers, Fremont, USA), 1:100 and for Ki-67, a monoclonal anti-human antibody (clone MiB-1, DakoCytomation, Glostrup, Dinmark), 1:300. Sections from prolactinomas were used as positive controls. Negative controls were processed by omitting the primary antibody and substituting it with non-immune serum.

The positivity for ICP and PRL-R was based in the presence of unequivocal marked cell. Ki-67 index was expressed as the percentage of labeled tumor nuclei out of the total number of, at least, 200 cells (from 220 to 1330 cells), counted in microscopic fields (20 $\times$ ) containing the highest number of mitoses. Only unequivocal marked nuclei were considered positive. A percentage of 10 or more marked nuclei was considered positive for Ki-67.

Venous blood sample was obtained prior to surgical procedure for chemoluminescence evaluation of basal PRL and TSH levels. Reference values were: TSH from 0,3 to 5,0mU/mL, PRL in men from 2 to 17ng/mL and, in women, from 3 to 29ng/mL.

## **Statistical analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and, in the presence of asymmetric distribution (Lang & Sestic, 1997), median and interquartile amplitude.

Comparison between four or more groups with regard to the presence of hiperprolactinemia and/or imunohistochemical findings was tested by variance analyses. The *t* test was used to compare data between two groups. Correlations were tested by Sperman's coefficient. Chi-squared test and Fisher's exact test were used to compare categorical variables. All data were log-transformed prior to analyses. A *p* value of < 0,05 was considered statistically significant. All statistical operations were performed using SPSS for Windows.

## RESULTS

With regard to clinical presentation, headache was detected in 63,4% of patients, mono or hemiparestesis in 39%, vertigo in 29,9%, altered level of consciousness in 26,8% and seizures in 20,7%. Serum PRL levels ranged from 2 to 70n/ml and hyperprolactinemia was detected in 25 cases (30,5%). Serum PRL and immunohistochemical data according to histological tumor type in these patients with hyperprolactinemia are illustrated in Table 1. Hyperprolactinemia was observed in 3/4 schwannomas (75%), 7/16 glioblastomas (43,7%) and 3/8 astrocytomas (37,5%). However, no statistically significant difference was observed in serum PRL distribution and frequency of hyperprolactinemia between the several histological types of CNS tumor (Fisher's exact test, *p*=0,26).

ICP (Figure 1) was detected in 18 patients (21,9%), in which serum PRL ranged from 2 to 32ng/mL (Table 2). A positive correlation was verified between PRL levels and the presence of ICP, in log-transformed data (Student's *t* test, *p*=0,022).

Concerning PRL-R, in was observed immunohistochemically in 32 cases (39%). The frequencies of hyperprolactinemia and positive ICP in this PRL-R positive population were 28,1 and 21,8%, respectively. Table 3 summarizes the results of ICP, PRL-R and

hyperprolactinemia in different histological types of CNS tumors. Figure 1 illustrates PRL-R positivity.

Referring to Ki-67 index, no statistically significant difference was verified between the value of Ki-67 index or its positivity, with serum PRL levels, presence of hyperprolactinemia, ICP, PRL-R (Table 4) or reintervention in patients with primary CNS tumors.

## DISCUSSION

In this work, the most frequent histological types of tumors were meningioma and tumors of neuroepithelial tissue (glioblastomas e astrocitomas), in disagreement with the current literature, which describes the frequency of gliomas in 50 to 80% of symptomatic primary CNS tumors, and of meningiomas in 25-30% of them (Sagar *et al.*, 2005). Besides, it was verified a female predominance in this sample, probably reflecting the highest prevalence of meningiomas, much more common in women (Lantos *et al.*, 2002). Regarding to age range, it was observed a mean age of 51 years, in agreement with the literature, which reports a peak of incidence for primary CNS tumors around the fifties (Radhakrishnan *et al.*, 1995; Flowers *et al.*, 2000).

The clinical manifestations presented according to what was expected: headache in more than 50% of the cases of brain tumors (DeAngelis, 2001; Pfund *et al.*, 1999) and seizures in 18 to 45% of cases (Cascino, 1990; Schaller & Rüegg, 2003).

The relation between PRL and CNS tumors claims for attention since 1980, when the first reports of cases of hyperprolactinemia associated with meningiomas were described (Shah *et al.*, em 1980; Kolodny *et al.*, 1985). More recently, a case of pronounced



hiperprolactinemia (1440ng/dL) associated with a gangliocitoma with PRL positive immunohistochemically (McCowen *et al.*, 1999) and the association between hiperprolactinemia and third ventricle epidermoid cyst were published (Santosh *et al.*, 2001).

In the studies mentioned above, there is no reference about exclusion of physiologic, pharmacologic and pathologic causes that could explain the altered PRL. In our study, in which this care was taken, hiperprolactinemia was a common finding, occurring in 30 of the cases, in 7 tumoral subtypes. The frequency of detection in 23% of meningiomas and in  $\frac{3}{4}$  of schwannomas is similar to previous findings of 27,3% of meningiomas and 61,5% os schwannomas (Ciccareli *et al.*, 2001). In our sample, the highest values of PRL were observed in astrocytomas. There is no description in the literature about elevated PRL levels in astrocytic tumors.

The proportion of hiperprolactinemia was twice as high in men as in women. This finding calls attention, once, in the general population, hiperprolactinemia is more common in women, affecting 15-20% of those with menstrual irregularities (Greer *et al.*, 1980), 30-40% of those with infertility (Prathibha *et al.*, 1994) and just 1-2% of men with erectile dysfunction and/or reduced libido (Akpunonu *et al.*, 1994).

The presence of intracellular PRL was observed in 21% of cases, in 7 tumoral subtypes. From the authors' knowledge, there is no data in the current literature about the immunohistochemical finding of intracellular PRL in CNS tumors of extra pituitary origin. More interesting is the finding of a positive correlation between serum PRL levels and the presence of intracellular PRL.

The presence of PRL-R was frequently observed in patients with primary CNS tumors (39%), also in several tumoral subtypes. Similar finding were reported previously,

detecting PRL-R positivity in 45,4 (Cicarelli *et al.*, 2001) and 61,7% (Muccioli *et al.*, 1997) of meningiomas, and 69,2% of schwannomas (Cicarelli *et al.*, 2001). In our study, as in Cicarelli's, no correlation between PRL-R positivity and occurrence of hyperprolactinemia was observed (Cicarelli *et al.*, 2001).

The Ki-67 index has been proved to be an accurate marker of cellular proliferation in CNS tumors (Petrowsky *et al.*, 2001). Nevertheless, the prognostic impact of this marker in the evolution of the CNS tumors is still not consensus. In this data, no significant difference of Ki-67 index between the principal histological types of tumors and the others immunohistochemical markers used was observed. In the same way, Bredel and colleagues failed to detect a significant difference of Ki-67 indexes between histological subtypes of CNS tumors (Bredel *et al.*, 2002). Besides that, no statistically significant difference was either observed in Ki-67 index of the patients submitted or not to surgical reintervention. This finding corroborates to the lack of correlation of Ki-67 index and survival (Bouvier-Labit *et al.*, 1998; Grzybicki & Moore, 1999; Roser *et al.*, 2004) and grade of tumoral invasion (Khoshyomn *et al.*, 1999) in CNS tumors. In counteracting, some studies have detected a positive correlation between Ki-67 index and tumoral invasion in pituitary adenomas (Pizarro *et al.*, 2004), shorter time of survival in gliomas (Montine *et al.*, 1994; Wakimoto *et al.*, 1996) and higher recidivating index in craniopharyngiomas (Izumoto *et al.*, 2005). On the contrary, Bredel and colleagues have demonstrated a positive relationship between a higher Ki-67 expression and a longer survival in glioblastomas (Bredel *et al.*, 2002).

In conclusion, the presence of hyperprolactinemia unassociated to known etiological factors in CNS tumors is relevant. And equally relevant is the presence of intracellular PRL and PRL-R in these tumors. Combined analysis of hiperprolactinemia, intracellular PRL

and PRL-R variables showed concomitant presence of two of them in several cases and, for twice, the coexistence of all. This evidence reinforces the suggestion of a modulator role for PRL, of intensity that remains to be explored, in the development of primary CNS tumors, in a context in which experimental studies had already shown mitogenic effect of PRL in meningiomas (Jimenez-Hakime *et al.*, 1993), gliomas (Raso *et al.*, 1999; Ducret *et al.*, 2002) and glioblastomas cultures-cells (Ducret *et al.*, 2002). This suggestion remains in a context of lack of relationship with cellular replication, once Ki-67 antigen detection reflects the proportion of cells that enters into cycle cell to be divided, not necessarily indicating the progression velocity through the cycle, or the tumor growth index. In this way, the spectrum of PRL participation in the neoplastic context can be situated in one of the several permissive or stimulator roles.

## REFERENCES

- Akpunonu BE, Mutgi AB, Federman DJ, York J, Woldenberg LS. Routine prolactin measurement is not necessary in initial evaluation of male impotence. *J Gen Inter Med* 1994;9:336-8.
- Ben-Jonathan N, Karen L, Molly M, Zinger M. Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:245-9.
- Ben-Jonathan N, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev* 1996;17:639-69.
- Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah NG, Vora HH, Suthar TP, Ghosh N, Chikhlikar PR, Trivedi TI. Prolactin as a local growth promoter in patients with breast cancer: GCRI experience. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:540-7.
- Bhatavdekar JM, Vora H, Balar D, Patel D, Shah N, Karelia N, Chiklikar P, Ghosh N, Dave R. Interrelationship of prolactin and its receptor in carcinoma of the colon and rectum: a preliminary report. *J Surg Oncol* 1994;55:246-9.
- Bonnetterre J, Peyrat JP, Vandewalle B, Beuscart R, Vie MC, Cappelaere P. Prolactin receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982;18:1157-62.
- Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C, Gambarelli D, Dufour H, Figarella BD. Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24:381-8.
- Bredel M, Piribauer M, Marosi C, Birner P, Gatterbauer B, Fischer I, Ströbel T, Rössler K, Budke H, Hainfellner A. High expression of DNA topoisomerase II $\alpha$  and Ki-67 antigen is associated with prolonged survival in glioblastoma patients. *Eur J Cancer* 2002;38:1343-7.

- Carroll RS, Schrell UM, Zhang J, Dashner K, Nomikos P, Fahlbusch R, Black PM. Dopamine D1, dopamine D2 and prolactin receptor messenger ribonucleic acid expression by the polymerase chain reaction in human meningiomas. *Neurosurgery* 1996;38:367-75.
- Cascino GD. Epilepsy and brain tumors: implications for treatment. *Epilepsia* 1990;31:37-44.
- Ciccarelli E, Razzore P, Gaia D, Todaro C, Longo A, Forni M, Ghè C, Camanni F, Muccioli G, Faccani G, Lanotte M. Hyperprolactinaemia and prolactin binding in benign intracranial tumors. *J Neurosurg* 2001;45:70-4.
- Costello LC, Franklin RB. Testosterone and prolactin regulation of metabolic genes and citrate metabolism of prostate epithelial cells. *Horm Metab Res* 2002;38:417-24.
- DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med* 2001;344:114-23.
- DeVito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 1992;130:2549-56.
- Ducret T, Boudina S, Sorin B, Vacher A, Gourdou I, Liguoro D, Guerin J, Bresson-Bepoldin L, Vacher P. Effects of prolactin on intracellular calcium concentrations and cell proliferation in human glioma cells. *Glia* 2002;38:200-14.
- Flowers A. Brain tumors in the older person. *Cancer Control* 2000;7:523-538.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000;80:1523-631.
- Greer ME, Moraczewski T, Rakoff JS. Prevalence of hyperprolactinemia in anovulatory woman. *Obstet Gynecol* 1980;56:65-9.

- Grzybicki DM, Moore SA. Implications of prognostic markers in brain tumors. *Clin Lab Med* 1999;19:833-47.
- Hasunuma I, Toyoda F, Yamamoto K, Yamashita M, Kikuyama S. Localization of prolactin receptor in the newt brain. *Cell Tissue Res* 2005;320:477-85.
- Izumoto S, Suzuki T, Kinoshita M, Hashiba T, Kagawa N, Wada K, Fugimoto Y, Hashimoto N, Saitoh Y, Maruno M, Yoshimine T. Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in craniopharyngiomas: correlation with clinical and histologic features. *Surg Neurol* 2005;63:520-5.
- Jimenez-Hakim E, el-Azouzi M, Black P. The effect of prolactin and bombesin on the growth of meningioma-derived cells in monolayer culture. *J Neurooncol* 1993;16:185-90.
- Khoshyomn S, Lew S, DeMattia J, Singer EB, Penar PL. Brain tumor invasion rate measured in vitro does not correlate with Ki-67 expression. *J Neurooncol* 1999;45:111-6.
- Kolodny J, Duihy R. Recurrent prolactinoma and meningioma following irradiation and bromocriptine treatment. *Am J Med* 1985;78:153-5.
- Lang TA, Secic M. How to report statistic in medicine. Philadelphia: American College of Physicians:1997.p.367.
- Lantos PL, Louis DN, Rosenblum MK, Kleihues P. Tumours of the nervous system. In: Graham DI, Lantos PL (eds). *Greenfield's Neuropathology*. London: Arnold:2002.p.767.

- Llovera M, Pichard C, Bernichtein S, Jeay S, Touraine P, Kelly PA, Goffin M. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRL-activated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 2000;19:4695-705.
- Mangurian LP, Jurjus AR, Walsh RJ. Prolactin receptor localization in the area postrema. *Brain Res* 1999;836:218-20.
- McCowen K, Glickman J, Black P, Zervas N, Lidov H, Garber J. Gangliocitoma masquerading as a prolactinoma. Case report. *J Neurosurg* 1999;91:490-5.
- Montine TJ, Vandersteenhoven JJ, Aguzzi A, Boyko OB, Dodge RK, Kerns BJ, Burger PC. Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. *Neurosurgery* 1994;34:674-8.
- Muccioli G, Ghe C, Faccani G, Lanotte M, Forni M, Ciccarelli E. Prolactin receptors in human meningiomas: characterization and biological role. *J Endocrinol* 1997;153:365-71.
- Nandi E, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci (PNAS)* 1995;92:3650-7.
- Ogueta S, Muñoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E, Garcia-Ruiz JP. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002;190:51-63.
- Peirce SK, Chen WY. Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR. *J Endocrinol* 2001;171:R1-R4.

- Petrowsky H, Sturm I, Graubitz O, Kooby A, Staib-Sebler E, Gog C, Köhne CH, Hillebrand T, Daniel PT, Fong Y, Lorenz M. Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases. *EJSO* 2001;27:80-87.
- Pfund Z, Szapáry L, Jászberényi O, Nagy F, Czopf J. Headache in intracranial tumors. *Cephalgia* 1999;19:787-90.
- Pizarro CB, Oliveira MC, Coutinho LB, Ferreira NP. Measurement of Ki-67 antigen in 159 pituitary adenomas using the MiB-1 monoclonal antibody. *Braz J Medical Biolog Res* 2004;37:235-43.
- Prathibha D, Govardhani M, Krishna PT. Prolactin levels in infertility and bromocriptine therapy in hyperprolactinemia. *J Indian Med Assoc* 1994;92:397-9.
- Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Ann Neurol* 1995;37:67-73.
- Raso GM, Meli R, Gualillo O, Pacilio M, Di Carlo R. Prolactin induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells. *J Neurochem* 1999;73:2272-7.
- Roser F, Samii M, Ostertag H, Bellinzona M. The Ki-67 proliferation antigen in meningiomas. Experience in 600 cases. Clinico-pathological study. *Acta Neurochir* 2004;146:37-44.
- Sagar SM, Israel MA. Primary and metastatic tumors of the nervous system. In: Kasper DL, Fauci A, Longo D, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, editors. *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 16<sup>th</sup>. NY:McGraw-Hill;2005:p. 2452.
- Santosh I, Rajshekhar V. Galatorrhea as the sole presenting symptom of a posterior third ventricular epidermoid cyst. *Surg Neurol* 2001;55:46-9.



- Schaller B, Rüegg SJ. Brain tumor and seizures: pathophysiology and its implications for treatment revisited. *Epilepsia* 2003;44:1223-32.
- Shah R, Leavens M, Saman N. Galactorrhea, amenorrhea and hyperprolactinemia as manifestations of parasellar meningioma. *Arch Intern Med* 1980;140:1608-12.
- Shiu RPC, Elsholtz HP, Tanaka T, Friesen HG, Gout PW, Geer CT, Noble RL. Receptor-mediated mitogen activation of prolactin receptor in rat lymphoma cell line. *Endocrinology* 1983;113:159-65.
- Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology* 1991;129:983-90.
- Vonderhaar BK. Prolactin involvement in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 1999;6:389-404.
- Wakimoto H, Aoyagi M, Nakayama T, Nagashima G, Yamamoto S, Tamaki M, Hirakawa K. Prognostic significance of Ki-67, labeling index obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. *Cancer* 1996;77:373-80.
- Wennbo H, Gebre-Medhin M, Gritli-Linde A, Ohlsson C, Isaksson OG, Tornell J. Activation of the prolactin receptor but not growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. *J Clin Invest* 1997;100:2744-51.
- Zinger M, McFarland M, Ben-Jonathan N. Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:689-96.

## APPENDICES

Table 1. Histological diagnosis, serum prolactin (PRL), presence of intracellular prolactin (ICP), prolactin receptor (PRL-R) and Ki-67 index in patients with hiperprolactinemia

Case	Age (years)	Sex	Histology	PRL (ng/mL)	ICP	PRL-R	Ki-67 (%)
1	56	M	Glioblastoma	26	positive	negative	8
2	56	F	Meningioma	32	negative	negative	3
3	66	F	Glioblastoma	32	positive	positive	20
4	20	F	Astrocytoma	61	negative	negative	5
5	41	F	Meningioma	31	negative	negative	3
6	60	M	Acoustic neurinoma	46	negative	negative	3
7	46	F	Meningioma	44	negative	positive	13
8	68	M	Glioblastoma	32	negative	positive	20
9	50	M	Schwannoma	19	negative	negative	3
10	18	M	Choroid plexus papiloma	40	negative	positive	20
11	62	M	Glioblastoma	25	negative	positive	30
12	71	M	Schwannoma	27	negative	negative	2
13	31	F	Astrocytoma	70	negative	negative	15
14	34	M	Glioblastoma	25	negative	positive	4
15	59	M	Astrocytoma	18	negative	positive	4
16	49	F	Meningioma	41	negative	negative	3
17	65	F	Meningioma	68	negative	negative	4

18	33	M	Glioblastoma	20	negative	negative	40
19	46	M	Meningioma	28	positive	positive	20
20	30	M	Schwannoma	18	positive	negative	10
21	63	F	Meningioma	50	negative	negative	35
22	70	M	Meningioma	20	negative	negative	7
23	77	M	Oligodendroglioma	30	positive	negative	40
24	64	F	Meningioma	47	negative	positive	6
25	36	M	Glioblastoma	27	negative	negative	3

---

Table 2. Histological diagnosis, serum prolactin (PRL), prolactin receptor (PRL-R) and Ki-67 index in patients with positive intracellular prolactin (ICP)

Case	Age	Sex	Histology	PRL (ng/mL)	PRL-R	Ki-67 (%)
1	56	M	Glioblastoma	<b>26</b>	Negative	8
2	36	F	Meningioma	2	Negative	10
3	62	F	Chordoma	14	Negative	5
4	66	F	Glioblastoma	<b>32</b>	Positive	20
5	51	M	Meningioma	7	Positive	2
6	10	F	Astrocytoma	12	Negative	2
7	35	M	Hemangioma	11	Negative	20
8	72	F	Meningioma	6	Positive	20
9	74	F	Meningioma	4	Negative	7
10	46	M	Meningioma	<b>28</b>	Positive	20
11	41	M	Astrocytoma	16	Positive	3
12	62	F	Glioblastoma	7	Negative	10
13	30	M	Schwannoma	<b>18</b>	Negative	10
14	77	M	Oligodendroglioma	<b>30</b>	Negative	40
15	34	M	Oligodendroglioma	6	Positive	70
16	54	M	Schwannoma	7	Negative	3
17	37	F	Meningioma	17	Positive	5
18	53	M	Oligodendroglioma	11	Negative	30

In bolding, cases of hyperprolactinemia

Table 3. Intracellular PRL (ICP), prolactin receptor (PRL-R) and hyperprolactinemia in histological types of CNS tumors

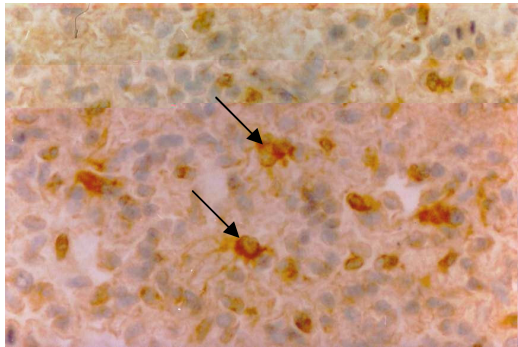
Histology (n)	Hyperprolactinemia n (%)	ICP + n (%)	PRL-R + n (%)	PRL-R + and ICP + n (%)
Meningioma (39)	9 (23,0)	6 (15,3)	18 (46,1)	4 (10,2)
Glioblastoma (16)	7 (43,7)	3 (18,7)	7 (43,7)	1 (6,2)
Astrocytoma (8)	3 (37,5)	2 (25,0)	3 (37,5)	1 (12,5)
Oligodendroglioma (5)	1 (20,0)	3 (60,0)	2 (40,0)	1 (20,0)
Schwannoma (4)	3 (75,0)	2 (50,0)	0 (0)	0 (0)
Others (10)	2 (20,0)	2 (20,0)	2 (20,0)	0 (0)
Total	25	18	32	7
p *	0,26	0,18	0,31	0,22

\* With respect to the difference in frequency of each variable in several cellular type (chi-squared test or Fisher's exact test, whenever necessary)

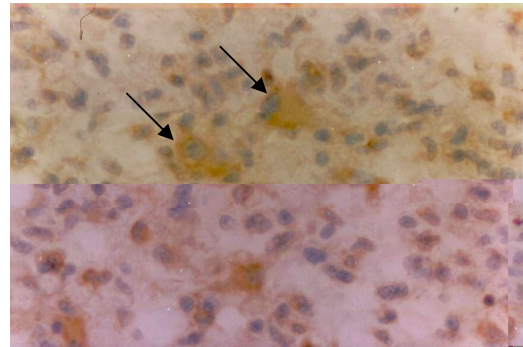
Table 4. Relationship between Ki-67 index, hyperprolactinemia, intracellular prolactin (ICP) e prolactin receptor (PRL-R) in patients with primary CNS tumors

Ki-67 index (n)	Hyperprolactinemia n (%)	ICP + n (%)	PRL-R + n (%)	ICP + and PRL-R + n (%)
Negative (44)	18 (72,0)	8 (44,4)	16 (50,0)	3 (42,9)
Positive (38)	7 (28,0)	10 (55,6)	16 (50,0)	4 (57,1)
Total	25	18	32	7
p*	0,16	0,61	0,52	0,41

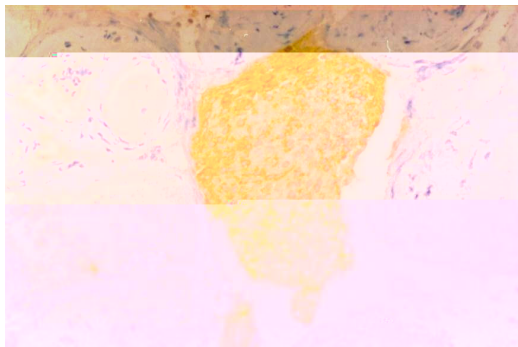
\* With respect to the difference in frequency of each variable in positive or negative Ki-67 especimes (Student's t test)



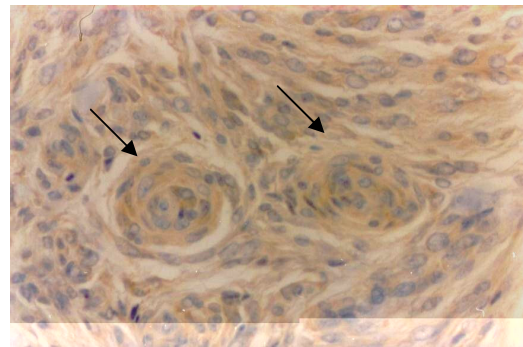
1a



1b



1c



1d

Figure 1.

1a. Case 311897: glioblastoma showing PRL-R positivity in well-differentiated neoplastic cells (astrocytic cells) (arrows) (obj. 40x).

1b. Case 311897: PRL-R positivity on the surface of well-differentiated neoplastic cells of a glioblastoma (arrows) (obj. 40x).

1c. Case 325421: meningioma with PRL-R positivity only in meningotheial cells (obj. 20x).

1d. Case 303991: meningioma with ICP positivity in meningotheial cells, characteristically situated in the whorls (arrows) (obj. 40x).

## **ANEXO 1**

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Pacientes**

Foi conduzido um estudo transversal prospectivo de pacientes internados no Hospital São José do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, RS, com diagnóstico provável de tumor primário do SNC e excisão cirúrgica do tumor durante o período de 01 de outubro de 2003 a 31 de setembro de 2005. Todos os pacientes foram submetidos à anamnese de rotina, com atenção especial aos medicamentos utilizados e dados pertinentes ao eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, conforme protocolo em anexo (Anexo 2).

#### Critérios de Inclusão:

Foram incluídos pacientes com diagnóstico provável de tumor primário do SNC, submetidos à excisão cirúrgica, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

#### Critérios de Exclusão:

- Pacientes com diagnóstico anátomo-patológico de neoplasia secundária metastática do SNC;
- Pacientes com hipotireoidismo primário e/ou insuficiência renal;
- Pacientes em uso de medicações classicamente associadas à hiperprolactinemia.



## **Métodos**

No dia anterior ao procedimento cirúrgico foi coletada amostra de sangue venoso (10mL) da região cubital periférica, às 08:00 horas, para dosagem de creatinina, PRL e TSH, após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. O material da coleta foi centrifugado e armazenado à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem hormonal, feita em um único momento, pelo método da quimioluminescência, utilizando-se *kits* de dosagem comerciais. Os valores de referência do método são: TSH de 0,3 a 5,0mU/mL, PRL em homens de 2 a 17ng/mL, PRL em mulheres de 3 a 29ng/mL.

O material proveniente da ressecção cirúrgica foi encaminhado para exame anátomo-patológico seguindo os procedimentos habituais do hospital. Posteriormente, porção do material fixado em parafina foi cortada (microtomia de 4 micrômetros) e fixada em lâminas de vidro para aplicação da técnica de imunoistoquímica para determinação da presença de PRL intracelular, de receptores de prolactina e de Ki-67. A técnica II utilizada está descrita no Anexo 4. Os anticorpos primários utilizados foram para a PRL intracelular, anticorpo policlonal anti-humano (DakoCytomation, Carpinteria/EUA), pronto para uso; para o R-PRL, anticorpo primário monoclonal anti-humano (clone PRL02, Neomarkers, Fremont/EUA), na diluição 1:100 e para o Ki-67, anticorpo monoclonal anti-humano (clone MiB-1, DakoCytomation, Glostrup/Dinamarca), 1:300. Esse estudo foi conduzido no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Patologia da FFFCMPA.

A positividade de PRL intracelular e de R-PRL foi considerada baseando-se na presença de uma célula inequivocamente marcada. O índice Ki-67 foi expresso como percentagem de núcleos marcados sobre um total de, no mínimo, 200 células (220 a 1300 células) contadas em campos microscópicos de maior concentração (20x). Apenas núcleos

inequivocamente marcados foram considerados na contagem. Uma percentagem de 10 ou mais núcleos marcados foi considerada como positividade para o Ki-67.

### **5.3 Análise Estatística**

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio-padrão e, na presença de assimetria, utilizou-se mediana e amplitude interquartil. Considerou-se assimetria em dado quantitativo quando o desvio padrão foi superior à metade do valor da média (Lang & Secic, 1997). A comparação de quatro ou mais grupos quanto à presença de hiperprolactinemia e/ou dos achados imunoistoquímicos foi realizada por análise de

**ANEXO 2**  
**HIPERPROLACTINEMIA E RECEPTORES DE PROLACTINA NOS TUMORES**  
**PRIMÁRIOS DO SNC**

**PROTOCOLO DE INTERNAÇÃO**

ETIQUETA
----------

**Caso número:** \_\_\_\_\_

**Identificação**

- Nome: \_\_\_\_\_
- Sexo: \_\_\_\_\_ 1 – Masc 2 - Fem
- Idade: \_\_\_\_\_
- Prontuário: \_\_\_\_\_
- Endereço e telefone: \_\_\_\_\_

**Dados clínicos**

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

**Laboratório**

- PRL sérica: \_\_\_\_\_
- TSH: \_\_\_\_\_

**ANEXO 3**  
**CENTRO DE NEUROENDOCRINOLOGIA DA SANTA CASA/POA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**Consentimento Livre e Esclarecido**

HIPERPROLACTINEMIA E RECEPTORES DE PROLACTINA, DOPAMINA E ESTRÓGENO EM  
TUMORES PRIMÁRIOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

---

**(Nome completo do paciente – preencher em letra de forma) - RG/Estado**

*Oliveira*

*Miriam da Costa*

*Consentimento Livre e Esclarecido*

*Dra Miriam da Costa Oliveira*

## ANEXO 4

### TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

1. cortar o bloco de parafina com uma espessura de 3 a 5 micrômetros;
2. colocar o corte na lâmina preparada com organosilano;
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 20 minutos à temperatura ambiente;
6. lavar em água destilada corrente;
7. colocar a lâmina em solução de água oxigenada 30 volumes (5 mL) e metanol (95 mL) durante 10 minutos por duas vezes;
8. lavar a lâmina em água destilada;
9. lavar a lâmina com 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 desejada, 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 universal, pronto para uso) cobrindo todo o tecido. Deixar por 30 minutos em estufa a 37 °C;
18. lavar com PBS duas vezes por 5 minutos;
19. aplicar StreptA-B do kit LSAB cobrindo todo o tecido. Deixar por 30 minutos em estufa a 37 °C;
20. lavar com PBS duas vezes por 5 minutos;
21. preparar o cromógeno DAB (diaminobenzidina) (100mL de PSB, 60mg de DAB e 1mL de água oxigenada a 30 volumes);
22. aplicar cromógeno DAB, cobrindo todo o tecido. Deixar por 5 minutos;
23. lavar em água destilada por 5 minutos;
24. contra-corar com hematoxilina por 30 segundos;
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 (cola especial)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)