

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



Quantificação Celular em Meningiomas

Cátia Sofia da Palma Correia

Orientador: Professor Doutor Guilherme de Brito Cortez Pimentel,

Co-Orientador: Mestre Pedro Jorge Filipe Pereira

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em Neurociências

2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA



Quantificação Celular em Meningiomas

Cátia Sofia da Palma Correia

Orientador: Professor Doutor José Guilherme de Brito Cortez Pimentel,

Co-Orientador: Mestre Pedro Jorge Filipe Pereira

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em Neurociências

2016

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de 24 de maio de 2016.

Agradecimentos

Esta tese de Mestrado não teria sido possível sem a colaboração e o incentivo de várias pessoas que ao longo deste ano e meio, contribuíram de uma forma ou de outra, para tal. A todos eles, o meu muito obrigada!

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor José Pimentel, o privilégio de me receber no seu grupo de trabalho, pelas incontáveis correções e sugestões, pelo conhecimento partilhado, e pela inteira disponibilidade demonstrada ao longo de toda a tese.

Ao meu co-orientador, o Mestre Pedro Pereira, pelo entusiasmo, pela disponibilidade, pelas orientações e força transmitida durante estes meses. Pela sua preciosa ajuda nos cortes histológicos e na preparação de TMAs que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os técnicos do laboratório de Neuropatologia do Hospital de Santa Maria pela simpatia e disponibilidade.

À Ana Sofia, Inês e Rafaela, por serem as pessoas que mais me compreenderam durante esta fase, por estarem sempre presentes, apesar de muitas vezes fisicamente longe. Agradeço-lhe a partilha de bons momentos e os estímulos nas alturas de desânimo.

À Margarida pelas infindáveis horas ao telefone, pelas gargalhadas pela sua amizade e espontaneidade.

Às minhas amigas e eternas companheiras da casa CAFICA, quero agradecer à Carla pela partilha dos momentos menos bons, por ser uma amiga dedicada e

sempre disponível para me ouvir, e à Filipa, pela guarida que me deu durante alguns dias, o que tornou a estadia em Lisboa muito mais divertida.

Por último, e não menos importante quer agradecer aos meus pais, por me ensinarem que a sorte não existe, mas que eu sou capaz de tudo, só tenho que trabalhar. Obrigada por serem as pessoas que são, por tudo o que me deram, por terem sempre lutado e acreditado em mim. Obrigada pelo apoio incondicional ao longo destes anos.

“The task is, not so much to see what no one has yet seen; but to think what nobody has yet thought, about that which everybody sees “

Erwin Schrödinger

Resumo

Os meningiomas são a segunda neoplasia mais frequente no SNC, e representa 26% de todos os tumores intracranianos. Estão divididos em três graus histológicos I, II e III de acordo com os critérios de anaplasia definidos pela OMS, no entanto, e para um diagnóstico inequívoco do grau de anaplasia é necessário a contribuição de indicadores quantitativos.

A atividade proliferativa de qualquer tumor pode ser determinada pela utilização de técnicas de imunohistoquímica com o anticorpo MM1, que deteta um epítipo do antígeno Ki-67, uma proteína nuclear, presente em toda a fase ativa do ciclo celular (G1,S,G2 e M). Contudo, o índice de Ki-67 não é utilizado como critério de anaplasia, devido à variabilidade das técnicas de imunohistoquímica em diferentes laboratórios. A utilização da densidade celular, um novo método quantitativo, permite superar este problema, uma vez que a contagem celular é independente do patologista.

O objetivo primário deste estudo foi determinar a densidade celular de uma amostra de 250 casos de meningioma, e quantificar o índice proliferativo, com o anticorpo ki-67. Pretende-se após esta determinação relacionar estes dois dados quantitativos entre si, e com o grau histológico, com os critérios da OMS. Como objetivo secundário pretendeu-se estabelecer valores, com a quantificação da densidade e do índice proliferativo, para os quais fosse possível diferenciar entre os vários diagnósticos histológicos, melhorando a capacidade de diagnóstica, tornando a classificação histológica, um pouco menos subjectiva.

Foram realizados *tissue microarrays*, dos diferentes casos, após selecção microscópica das áreas mais representativas.

Dos 250 meningiomas analisados, 140 foram de grau I, 79 de grau II e 31 de grau III. O rácio entre indivíduos do sexo feminino e masculino foi de 1,86:1. A análise dos

resultados deste estudo demonstrou que a média do índice proliferativo foi de $3,85 \pm 4,97\%$, $2,70 \pm 2,60\%$ e $1,81 \pm 2,52\%$, em meningiomas anaplásicos, atípicos e benignos, respetivamente ($p=0,001$).

A média da densidade celular foi de $14,8 \pm 3,68$ células/ $100\mu\text{m}^2$, $13,5 \pm 2,80$ células/ $100\mu\text{m}^2$ e $12,5 \pm 0,04$ células/ $100\mu\text{m}^2$ para meningiomas anaplásicos, atípicos e benignos, respetivamente ($p<0,0001$).

A análise preliminar das curvas ROC demonstrou que o ponto de corte obtido foi de 1,63% para o índice de Ki-67 e de 14,2 células/ $100\mu\text{m}^2$ para a densidade celular.

Foram encontradas diferenças significativas na expressão do Ki-67 e densidade celular entre os subtipos de meningiomas de grau I, sendo a variante meningotelial aquela obteve uma expressão superior aos restantes subtipos.

Palavras-chaves: Meningiomas, imunohistoquímica, índice proliferativo (Ki-67), indicadores quantitativos

Abstract

Meningiomas represent the second most common central nervous system neoplasms in adults and account for 26% of all primary brain tumors. Meningiomas are divided histologically, by morphologic features, into three grades by anaplastic criteria defined by the World Health Organization (WHO). However, for an unequivocal diagnosis of the histological grade is necessary a contribution of quantitative indicators.

Proliferative activity in tumors can be determined by immunohistochemistry using the MM1 antibody that is to be able to detect an epitope on the Ki-67 antigen, a nuclear protein present only during active phase of the cell cycle (G1, S, G2, and M). Nevertheless, the use of Ki-67 immunohistochemistry raises some questions on the reproducibility due mainly to the variability of different techniques between different laboratories. The use of cell density, a new quantification parameter, could be a new method to supporting the diagnostic, once it's independent of pathologist.

Therefore, the aim of this study was to explore the relationship between some quantitative histological features of meningioma, cell density and Ki-67 staining index on 250 patients with meningioma, in the most common histological types. The secondary aim was to determine the optimal cut-off value for cell density and Ki-67 Li. Appropriate areas of the meningioma tissue were selected using a tissue microarray and analyzed by automated counting cells with image J software on digital images.

Of 250 meningiomas analyses, were 140 grade I, 79 grade II and 31 grade III. Female to male ratio was 1,86:1. The results of our investigations indicate that the mean Ki-67 labeling index was $3,85 \pm 4,97\%$, $2,70 \pm 2,60\%$ and $1,81 \pm 2,52\%$ to anaplastic, atypical and benign meningioma, respectively. There was significant correlation between Ki-67 levels and tumor subtypes ($p=0,001$).

The mean of cell density was $14,8 \pm 3,68$ core/ $100\mu\text{m}^2$, $13,5 \pm 2,80$ core/ $100\mu\text{m}^2$ and $12,5 \pm 0,04$ core/ $100\mu\text{m}^2$ to anaplastic, atypical and benign meningioma, respectively. There was significant correlation between cell density and tumor subtypes ($p < 0,0001$)

The analysis of ROC curve showed that the optimal cut-off value for Ki-67 was 1,63% and for cell counting was $14,2$ core/ $100\mu\text{m}^2$.

We found differences between meningioma subtypes of grade I and Ki-67 expression. Meningothelial meningiomas had the highest mean value for Ki-67.

The Ki-67 LI is one important tool in addition to routine histological evaluation of meningioma, but a combination with other methods will improve it. However, more extended studies are needed for approval of this suggestion.

Key words: Meningiomas, immunohistochemistry, Ki-67 LI, quantitative histology

Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo	ix
Abstract	xi
Prólogo	xix
1. Introdução	1
1.1. Origem embrionária das meninges.....	2
1.1. Meninges.....	3
1.1.1. Dura-máter.....	4
1.1.2. Aracnóideia	5
1.1.3. Pia-máter	5
1.2. Meningiomas	5
1.2.1. Epidemiologia	6
1.2.2. Classificação histológica.....	6
1.2.3. Características Clínicas	10
1.2.4. Causas e Fatores de Risco.....	10
1.2.5. Tratamento dos meningiomas.....	14
1.2.6. Prognóstico	16
1.3. Ciclo Celular	16
1.3.1. Fases do Ciclo celular.....	18
1.3.2. Regulação do ciclo celular/ Pontos de restrição	20
1.4. Anticorpo Ki-67	21
1.4.1. Estrutura	21
1.4.2. Função.....	23
1.4.3. Ki-67 em meningiomas	24
1.5. Quantificação celular	24
1.6. <i>Tissue Microarray</i>	26
2. Objetivos	2
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1. Dados clínicos e classificação histopatológica	31

3.2.	<i>Tissue Microarray</i>	32
3.3.	Imunohistoquímica	32
3.3.1.	Protocolo de Imunohistoquímica.....	32
3.3.2.	Análise quantitativa da expressão do Ki-67 e da densidade celular	34
3.4.	Análise estatística.....	35
4.	Resultados	39
4.1.	Características da amostra.....	41
4.2.	Índice proliferativo em meningiomas	43
4.3.	Índice proliferativo (Ki-67).....	44
4.4.	Densidade Celular	49
4.5.	Curvas ROC	52
4.6.	Expressão das variáveis quantitativas.....	53
5.	Discussão	55
5.1.	Variáveis Clínicas	56
5.2.	Índice proliferativo	57
5.3.	Densidade Celular.....	58
5.4.	Curvas ROC	59
5.5.	Limitações do estudo e perspectivas futuras	60
5.6.	Considerações finais	61
6.	Conclusão	62
7.	Anexos	65
8.	Bibliografia	67

Lista de figuras

FIGURA 1- O SNC DURANTE A 3º E 4º SEMANAS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO. FORMAÇÃO DA PLACA NEURAL QUE DEPOIS SE TRANSFORMA EM DO SULCO NEURAL (A) E, MAIS TARDE, EM TUBO NEURAL (B) (7)	2
FIGURA 2 – MENINGES ENCEFÁLICAS (9).....	3
FIGURA 3 - MENINGES DA MEDULA ESPINHAL (VISTA POSTERIOR) (9).....	4
FIGURA 4 - MENINGIOMAS DE GRAU I (MENINGOTELIAL - TRANSIÇÃO – FIBROBLÁSTICO, ESQUERDA PARA A DIREITA) (HE; X400)	7
FIGURA 5 - MENINGIOMAS ATÍPICO (HE; X400); CÉLULA EM MITOSE (ABAIXO DA SETA)	8
FIGURA 6 - MENINGIOMAS ANAPLÁSICOS (HE; X400).....	8
FIGURA 7 -MENINGIOMA EXTRA-AXIAL. QUISTO ARACNOIDE REATIVO (SETA) ABAIXO DA LESÃO (22)	10
FIGURA 8- CICLO CELULAR	17
FIGURA 9 - AS VÁRIAS FASES DO CICLO CELULAR: (A) FASE G2; (B) PROFASE; (C) (D) METAFASE; (E) ANAFASE; (F) TELOFASE; (G) FASE G1.....	19
FIGURA 10 -CONSTRUÇÃO DE UM TMA.....	27
FIGURA 11 - TMA APÓS IMUNOMARCAÇÃO COM KI-67	33
FIGURA 12 - IMAGEM DIGITAL DO CAMPO MICROSCÓPIO DEMONSTRANDO OS NÚCLEOS IMUNORREATIVOS (NÚCLEOS A CASTANHO) DE UM MENINGIOMA ANAPLÁSICO, ANTES (ESQUERDA) E DEPOIS (DIREITA) TER SIDO AVALIADO PELO SOFTWARE/IMAGE J.....	44

Lista de tabelas

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS MENINGIOMAS DA OMS [ADAPTADO DO RIEMENSCHIEDER ET AL.(16)]	9
TABELA 2- EXTENSÃO DE RESSECÇÃO CIRÚRGICA NOS MENINGIOMAS (GRAUS DE SIMPSON)(13).....	15
TABELA 3- CONDIÇÕES PARA A DETERMINAÇÃO DO TAMANHO NUCLEAR COM PLUGIN <i>NUCLEUS COUNTER</i> ..	35
TABELA 4- TESTE DE LEVENE PARA AS VARIÁVEIS EM ESTUDO EM FUNÇÃO DO DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO..	35
TABELA 5- TESTE DE LEVENE PARA AS VARIÁVEIS EM ESTUDO EM FUNÇÃO DO SEXO DOS DOENTES.....	36
TABELA 6 - MENINGIOMAS DIAGNOSTICADOS NO LN DO HSM (CHLM).....	40
TABELA 7 – PERCENTAGEM DE DOENTES INCLUÍDOS EM RELAÇÃO AO SEXO E RESPECTIVA RELAÇÃO COM O GRAU DE ANAPLASIA E VARIANTES DO GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO)	41
TABELA 8- MÉDIA E MEDIANA DAS IDADES NOS VÁRIOS GRAUS DE ANAPLASIA E VARIANTES DO GRAU I (MENINGOTELIAL, FIBROBLÁSTICO, TRANSIÇÃO)	42
TABELA 9-ÍNDICE PROLIFERATIVO (KI-67) (NÚCLEOS CASTANHOS-ESCUROS) NOS MENINGIOMAS ANAPLÁSICOS (GRAU III), ATÍPICOS (GRAU II) E FIBROBLÁSTICOS, MENINGOTELIAIS E TRANSIÇÃO (GRAU I)	43
TABELA 10- COMPARAÇÃO DOS VALORES MÉDIOS DO ÍNDICE PROLIFERATIVO (KI-67) PARA CADA GRAU DE ANAPLASIA E VARIANTE DO GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO).....	46
TABELA 11- <i>p</i> -VALUE OBTIDOS NO TESTE DE <i>TUKEY</i> PARA COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS GRAUS DE ANAPLASIA E VARIANTES DO GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO) EM RELAÇÃO AO ÍNDICE PROLIFERATIVO	48
TABELA 12- COMPARAÇÃO DOS VALORES MÉDIOS DA DENSIDADE CELULAR PARA CADA GRAU DE ANAPLASIA VARIANTES DO GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO)	50
TABELA 13- <i>P-VALUE</i> OBTIDOS NO TESTE DE <i>TUKEY</i> , PARA COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS DOS GRAUS DE ANAPLASIA E VARIANTES DO GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO) EM RELAÇÃO À DENSIDADE CELULAR.....	51
TABELA 14 -DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE KI-67 E DENSIDADE CELULAR NOS TRÊS GRAUS DE ANAPLASIA E VARIANTES DO GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO)	54

Lista de gráficos

GRÁFICO 1- MENINGIOMAS DIAGNOSTICADOS NO LN DO HSM (CHLM).....	40
GRÁFICO 2 – MÉDIA DE IDADES ENTRE OS DIFERENTES GRAUS DE ANAPLASIA E VARIANTES DO GAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO).....	42
GRÁFICO 3- MÉDIA DO ÍNDICE PROLIFERATIVO (KI-67) EM FUNÇÃO DO GRAU DE ANAPLASIA E VARIANTES DE GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO)	45
GRÁFICO 4- ÍNDICE PROLIFERATIVO (KI-67) PARA CADA GRAU DE ANAPLASIA E VARIANTES DE GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO).....	45
GRÁFICO 5- ÍNDICE PROLIFERATIVO (KI-67) PARA OS GRAUS DE ANAPLASIA I, II E III.....	46
GRÁFICO 6 – RELAÇÃO ENTRE O ÍNDICE PROLIFERATIVO (KI-67) E O SEXO DOS DOENTES	47
GRÁFICO 7- COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DOS DIFERENTES GRAUS DE ANAPLASIA E VARIANTES DO GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO) EM RELAÇÃO AO ÍNDICE PROLIFERATIVO PELO CONTRASTE <i>TUKEY</i>	48
GRÁFICO 8 – DENSIDADE CELULAR PARA CADA GRAU DE ANAPLASIA E VARIANTES DE GRAU I	49
GRÁFICO 9- DENSIDADE CELULAR PARA OS GRAUS DE ANAPLASIA I, II E III	50
GRÁFICO 10- RELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE CELULAR E O SEXO DOS DOENTES	51
GRÁFICO 11- COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DOS DIFERENTES GRAUS DE ANAPLASIA E VARIANTES DO GRAU I (FIBROBLÁSTICO, MENINGOTELIAL E TRANSIÇÃO) EM RELAÇÃO À DENSIDADECELULA ATRAVÉS DO CONTRASTE <i>DETUKEY</i>	52
GRÁFICO 12- CURVA ROC: A) ÍNDICE PROLIFERATIVO E B) DENSIDADE CELULAR.....	53

Lista de abreviaturas e siglas

Ac- Anticorpo

ADN-Acido Desoxirribonucleico

Ag - Antigénio

BSA - Albumina Sérica Bovina

CDK-Quinases Dependentes de Ciclina

DAB - 3,3' – diaminobenzidina

G1 - *Gap* 1

G2 - *Gap* 2

HPF-Campos de Grande Ampliação

HSM – Hospital Santa Maria

IRM- Imagem por Ressonância Magnética

LN – Laboratório de neuropatologia

LCR- Líquido Cefalorraquidiano

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão Fosfato-Alcalino

ROC- Características de Operação do Recetor

RT- Radioterapia

S – Síntese de ADN

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

TMA - Tissue Microarray

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Prólogo

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuropatologia do Hospital de Santa Maria (CHLN) sob a orientação do Professor Doutor José Pimentel e co-orientação do Mestre Pedro Pereira. Insere-se no âmbito do projeto tese do 2º ano do Mestrado em Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Estima-se que sejam diagnosticados cerca de 11 milhões de novos casos por ano, e que, aproximadamente, 7 milhões de pessoas morram devido a esta doença (1). Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) representam cerca de 2% de todas as neoplasias (2), o que, relativamente à população portuguesa, corresponde a uma incidência de 4,4 novos casos/ano/100.000 habitantes nos indivíduos do sexo masculino e de 4,9 novos casos/ano/100.000 nos do feminino (3).

Apesar dos meningiomas serem um tumor cerebral frequente, os seus critérios de anaplasia histológica permanecem imprecisos, o que é explicado pela discrepância entre estes e o seu comportamento biológico. Uma das principais causas para este facto está na subjetividade de apreciação de alguns destes critérios, o que torna premente o desenvolvimento de outros parâmetros. Um deles poderá ser a quantificação da densidade celular dos meningiomas.

Desta forma, urge a realização de novos estudos que quantifiquem a densidade celular dos meningiomas numa amostra substancial de tumores, correlacionando-os com os critérios de anaplasia, entre os quais o índice proliferativo. Eles permitirão acrescentar parâmetros objetivos à classificação histológica dos meningiomas, contribuindo para uma melhor compreensão do seu comportamento biológico após cirurgia.

1. Introdução

1.1. Origem embrionária das meninges

A formação do SNC tem início durante a terceira semana de desenvolvimento embrionário com a formação da placa neural na região dorsal do embrião, por ação da notocórdia. A placa neural alonga-se e dobra-se sobre si mesma, dando origem ao sulco neural. Os bordos deste sulco fundem-se a partir da região central e formam o tubo neural, responsável pelo desenvolvimento do encéfalo e da medula espinhal (4 – 6) (Fig. 1).

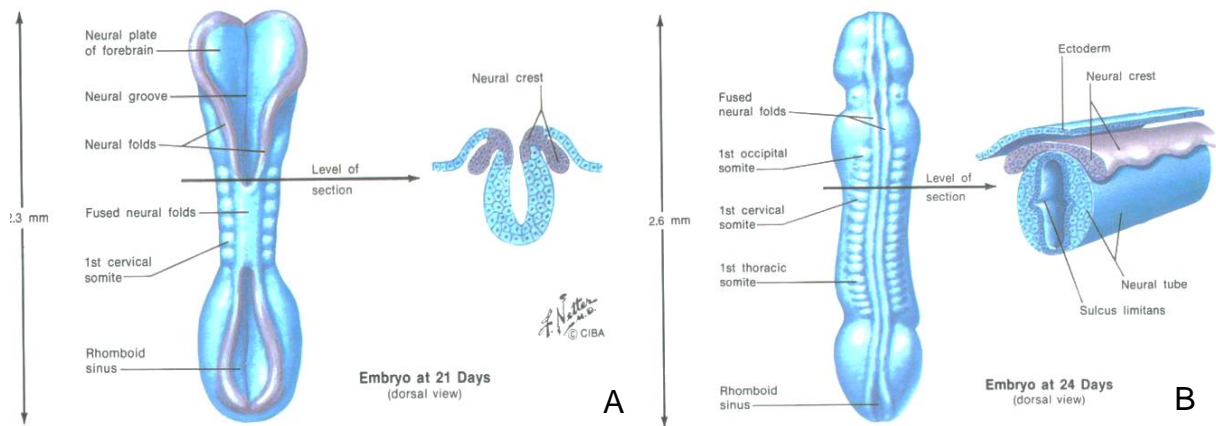


Figura 1- O SNC durante a 3^o e 4^o semanas do desenvolvimento embrionário. Formação da placa neural que depois se transforma em do sulco neural (A) e, mais tarde, em tubo neural (B) (7)

Após a formação do tubo neural, dois conjuntos de células situados por cima e ao lado do mesmo constituem as cristas neuronais, responsáveis pela origem da maioria das estruturas do Sistema Nervoso Periférico (SNP), como é o caso da membrana aracnóideia e da pia-máter (6).

O tubo neural é envolvido por uma membrana mesenquimatosa, a qual, com a crista neural, está presente na formação das meninges primárias. Estas, durante o desenvolvimento embrionário, diferenciam-se e originam duas camadas distintas: as paquimeninges (dura-máter) e as leptomeninges (conjunto formado pela aracnóideia e pia-máter) (7).

1.1. Meninges

Os tecidos que fazem parte do encéfalo e da medula espinhal são envolvidos, o primeiro pela calote craniana, o segundo pelo canal vertebral ósseo, e ambos pelas meninges. Estas são formadas por três membranas: a dura-máter, a mais externa subjacente aos ossos do crânio, a aracnóideia, a média, e a pia-máter, a que acompanha toda a superfície do encéfalo e medula espinhal (6) (Fig. 2)

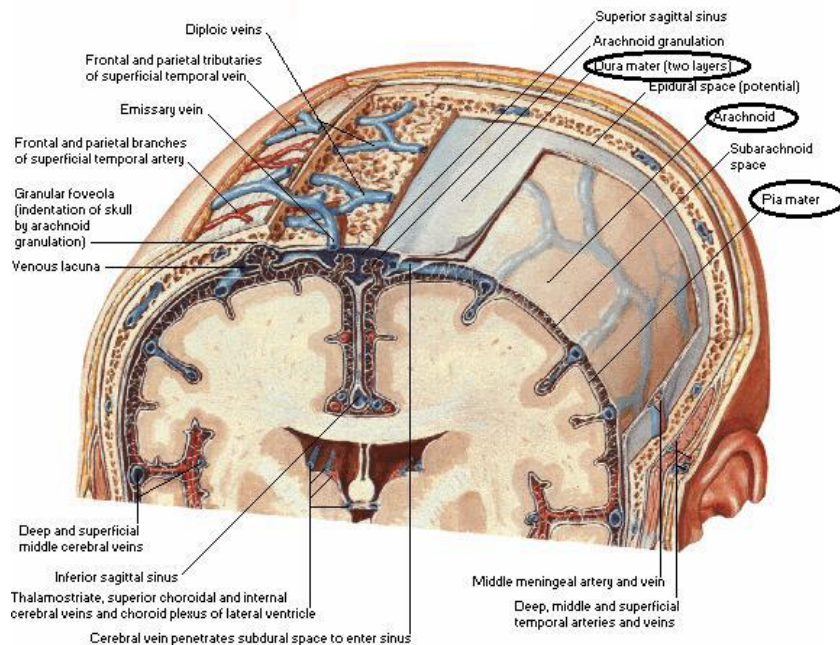


Figura 2 – Meninges encefálicas (9)

As meninges revestem a medula espinhal no canal vertebral e são perfuradas (buracos de conjugação) para dar saída às raízes espinhais. São responsáveis pela proteção mecânica do encéfalo e da medula espinhal, formando uma barreira física que impede a invasão do SNC por agentes externos, para além de ser o local de reabsorção do líquido cefalorraquidiano (LCR). Desta forma, podem modular eventos fisiológicos e patológicos do SNC (6).

Existem diferenças embrionárias e anatômicas entre as meninges encefálicas e as da medula espinhal, uma vez que as primeiras são originárias do mesênquima e da crista neural, enquanto as segundas provêm do mesênquima paraxial (8).

1.1.1. Dura-máter

A dura-máter fica aderente ao bordo do *foramen magnum* na sua extremidade superior e à parede do canal vertebral da segunda vértebra sacrada no topo inferior (Fig. 3) (6,9).

A dura-máter é espessa, fibrosa e inervada por fibras sensitivas provenientes do nervo trigêmio e dos nervos cervicais superiores (6). A sua camada periosteal adere à superfície interna da calote craniana, pelo que não existe espaço físico entre as duas estruturas. Assim, o espaço epidural é virtual, preenchido apenas em condições patológicas (10).

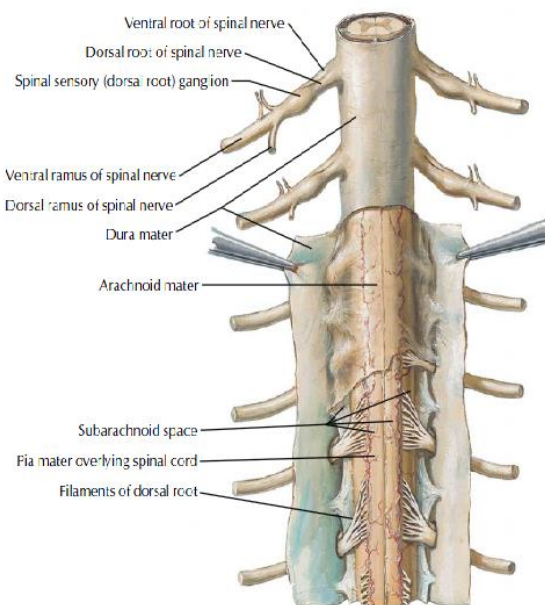


Figura 3 - Meninges da medula espinhal (vista posterior) (9)

1.1.2. Aracnóideia

A aracnóideia é uma membrana fina e trabeculada, formada por tecido conjuntivo pouco vascularizado. Entre a aracnóideia e a pia-máter localiza-se o espaço subaracnoídeu, que contém o LCR (6,7). Em certos locais do encéfalo, o espaço subaracnoídeu alarga-se e forma as cisternas subaracnoídeas. Focalmente, a membrana aracnóideia forma expansões que perfuram a dura-máter e terminam em dilatações fechadas, denominadas vilosidades aracnóideias ou granulações de Pacchioni, responsáveis pela absorção do LCR e pela origem de grande parte dos meningiomas (11,12)

1.1.3. Pia-máter

A camada mais interna das meninges está aderente à superfície do cérebro, seja nas circunvoluções, seja nos sulcos. É composta por pequenos plexos de vasos sanguíneos incorporados no tecido conjuntivo, externamente cobertas por células mesoteliais. Quando vasos sanguíneos de pequeno calibre penetram no tecido cerebral, a pia-máter e a aracnóideia acompanham-nos, criando espaço à volta do vaso denominado espaço perivascular ou de Virchow-Robin. Atualmente é sugerido que ele possa servir como um canal para a passagem de LCR no tecido cerebral, embora a sua função exata não esteja ainda estabelecida (6).

1.2. Meningiomas

Os meningiomas são os tumores mais frequentes do SNC, descritos pela primeira vez em 1614 por Felix Plater. Têm origem nas células meningoteliais que constituem a membrana aracnóideia (13).

1.2.1. Epidemiologia

Os meningiomas constituem cerca de 13 a 26% de todos os tumores intracranianos e 25% dos da medula espinhal (14). São mais frequentes em idosos, sendo o pico de incidência na sexagésima e septuagésima décadas de vida (15). É estimado, em contexto de autópsia, que 2 a 3% da população terá meningiomas assintomáticos, dos quais 8% são múltiplos (15). Existe uma predominância clara do sexo feminino, com uma razão de 2:1. Nos casos de meningiomas da medula espinhal a predominância é superior (10:1), particularmente nos da região torácica (16,17). A estimativa de ocorrência anual de meningiomas é de 2-7 em cada 100.000 indivíduos do sexo feminino e de 1-5 por cada 100.000 do sexo masculino. No entanto, os meningiomas mais agressivos são mais comuns no género masculino (14).

Em crianças e adolescentes, os meningiomas são raros, mas quando existentes estão, em regra, associados a síndromes hereditários e com tendência para um comportamento mais agressivo (14).

1.2.2. Classificação histológica

A classificação histológica dos meningiomas é baseada no seu comportamento biológico pós-operatório, de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2007 (16) (Tabela 1).

São classificados em: benignos (grau I), atípicos (grau II) e anaplásicos (grau III), sendo que os graus II e III apresentam níveis mais elevados de anaplasia.

1.2.2.1. Meningiomas benignos

Os meningiomas de grau I, benignos, representam cerca de 80% de todos os meningiomas. São reconhecidos por uma histomorfologia típica, sendo os meningoteliais, os fibroblásticos e os de transição as variantes histológicas mais frequentes (15) (Fig.4).

Os meningiomas meningoteliais são histologicamente compostos por células de núcleos ovais e cromatina não condensada, dispostas em pseudo-sincício. Os meningiomas fibroblásticos são essencialmente compostos por células alongadas, fusiformes e dispostas em fascículos incorporados numa matriz rica em colagénio (16). Os meningiomas de transição combinam as características dos dois subtipos anteriores, sendo frequente a presença de “novelos” onde as células se enrolam em camadas concêntricas; a deposição de cálcio nesses “novelos” dá origem aos chamados “corpos psamomatosos”, do grego psamos (areia), que são estruturas lameladas e concêntricas (16).

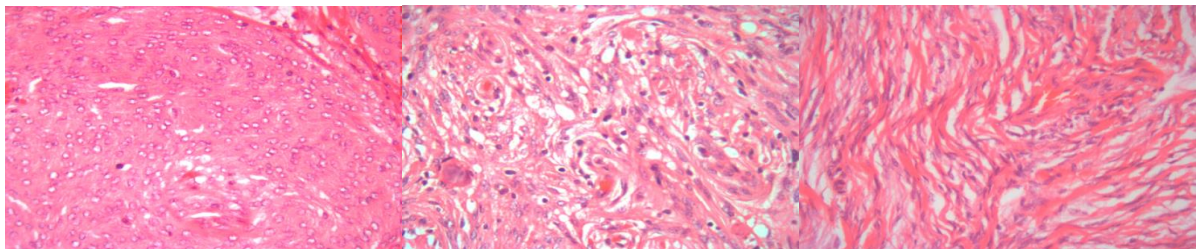


Figura 4 - Meningiomas de grau I (meningotelial - transição – fibroblástico, esquerda para a direita) (HE; x400)

1.2.2.2. Meningiomas atípicos

Os meningiomas de grau II, atípicos, representam 5 a 15% de todos os meningiomas. Caracterizam-se pela co-existência de um aumento do índice mitótico [> 4 mitoses/10 campos de grande ampliação (HPF)] e de três, ou mais, das seguintes características: aumento da celularidade (hipercelularidade), núcleos proeminentes, perda da arquitetura típica (pleomorfismo celular), pequenas células com uma razão núcleo/citoplasma elevado, necrose (16,18 – 20) (Fig.5).

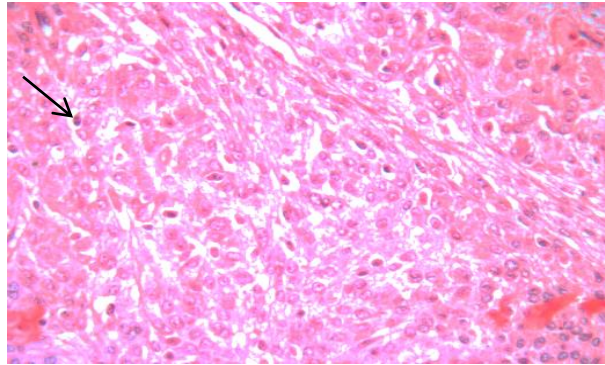


Figura 5 - Meningiomas atípico (HE; x400); Célula em mitose (abaixo da seta)

1.2.2.3. Meningiomas anaplásicos

Os meningiomas de grau III, anaplásicos, representam 1 a 3% de todos os casos. Este grau de anaplasia está associado, frequentemente, tal como noutras neoplasias malignas, à invasão dos tecidos limítrofes e à metastização (14,16). Caracterizam-se por uma perda da citoarquitetura habitual, por um elevado índice mitótico (> 20 mitoses /10 HPF) e por áreas de necrose (16,21) (Fig.6).

A invasão do parênquima cerebral limítrofe é definida histologicamente por ilhotas de células neoplásicas que invadem o tecido cortical subjacente. Este parâmetro, embora não utilizado como critério de anaplasia pela classificação da OMS, é considerado, por si só, um critério de anaplasia, uma vez que está associado a um maior número de recorrências (15).

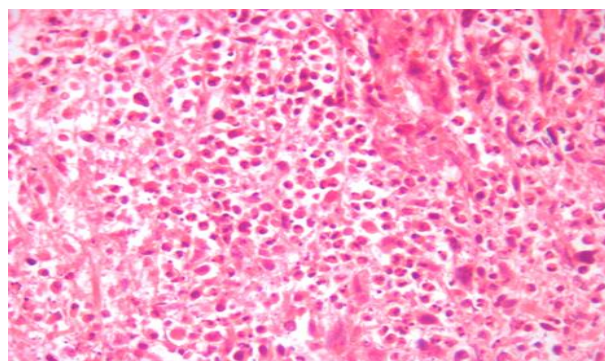


Figura 6 - Meningiomas anaplásicos (HE; x400)

Introdução I Quantificação celular em meningiomas

Tabela 1 - Classificação dos meningiomas da OMS [Adaptado do Riemenscheider et al.(16)]

Grau	Frequência	Taxa de Recorrência	Variante Histopatológica	Figuras patológicas
Grau I	80-90%	7-20%	Meningotelial Fibroblástico Transição Psamomatoso Angiomatoso Microcístico Secretor Linfoplasmocítico Metaplásico	Pleomorfismo Ausência de critérios de meningiomas atípicos e anaplásicos Figuras mitóticas ocasionais Outras variantes histológicas para além dos meningiomas de células claras, papilar e rabdoídes.
Grau II	5-15%	30-40%	Atípico Cordóide Células claras	Índice Mitótico ≥ 4 mitoses/10HPF ≥ 3 dos seguintes critérios: <ul style="list-style-type: none"> ○ Aumento da celularidade/hipercelularidade; ○ Núcleos proeminentes; ○ Perda da arquitetura típica/pleomorfismo celular; ○ Pequenas células com uma razão núcleo/citoplasma elevado; ○ Necrose Invasão do parênquima cerebral
Grau III	1-3%	50-80%	Anaplásico Rabdoide Papilar	Índice Mitótico ≥ 20 mitoses/ 10HPF Necrose

1.2.3. Características Clínicas

Os meningiomas podem-se desenvolver silenciosamente durante muitos anos, pelo que a sua frequência está subestimada (22). Os meios complementares de diagnósticos usados são a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM)(23).

A apresentação clínica depende da localização e do tamanho do tumor inicial (14).

Podem ser encontrados em todo o crânio, sendo mais frequentes na região parasagital, no seio cavernoso, na convexidade, no bulbo olfativo e na fossa posterior. Os da medula espinal ocorrem na região dorsal em cerca 80% dos casos (14,21).

Têm um crescimento relativamente lento e podem estar associados a um aumento gradual da pressão intracraniana. Os sintomas mais frequentes, e que levam à observação clínica, são as cefaleias, os sinais focais e as crises epiléticas (15,16,21)(Fig.7).



Figura 7 -Meningioma extra-axial. Quisto aracnoide reativo (seta) abaixo da lesão (22)

1.2.4. Causas e Fatores de Risco

A maioria dos meningiomas é esporádica, no entanto, estão estabelecidos fatores que aumentam o risco de ocorrência:

1.2.4.1. Traumatismo craniano

O traumatismo craniano tem sido sugerido como um fator de risco para a indução de meningiomas, embora os resultados dos vários estudos não sejam consistentes. O mecanismo proposto consiste na alteração da barreira hematoencefálica e um consequente influxo maciço de citocinas, histamina e bradicinina no espaço extravasal (14).

Em 2002, Phillips *et al.* realizou um estudo de caso controle baseado em 200 traumatismos cranianos e 400 controles, no qual os resultados corroboraram esta teoria. Ainda assim, não ficou comprovado que as associações observadas mantinham uma relação de causa-efeito (24).

Por outro lado, também existem algumas observações que refutam esta hipótese, nomeadamente as de Annegers *et al.* que desenharam um estudo prospetivo com 2.953 pessoas com traumatismos cranianos, e cujo resultado demonstrou não haver qualquer relação entre os tumores cerebrais e a localização ou gravidade do traumatismo craniano. Os autores concluem ainda que os traumatismos não parecem ser um fator de risco, uma vez que os meningiomas têm uma maior incidência em adultos do sexo feminino, enquanto que os traumatismos cranianos incidem maioritariamente em indivíduos do sexo masculino (25). Eskandary *et al.* verificaram, através da TC, que a incidência de tumores cranianos era de 8 em cada 3.000 pessoas com traumatismos cranianos (26). Desta forma, e como já referido, a relação entre traumatismo craniano e o risco de meningioma não parece confirmar-se (27).

1.2.4.2. Radiação ionizante

Doses elevadas de radiação parecem ser outro fator de risco no aparecimento de meningiomas. Alguns estudos indicam que sobreviventes das bombas atômicas demonstraram um aumento da probabilidade para o seu aparecimento (28).

A utilização de pequenas doses de radiação inseridas na zona craniana, tais como as necessárias numa radiografia panorâmica (ortopantomografia), pode aumentar a probabilidade de desenvolvimento de meningiomas (29).

Num estudo de coorte realizado em 445 crianças com menos de 16 anos, tratadas com uma dose elevada de radiação, o risco cumulativo de aparecimento de um meningioma foi de 0,53%, 1,2% e 8,18% para 10, 20 e 25 anos, respetivamente. O mesmo estudo demonstrou ainda que elevadas doses de radiações cranianas, utilizadas no tratamento de gliomas, doenças hematológicas ou metástases cerebrais, podem conduzir a um maior risco de aparecimento de meningiomas após um período de latência de 25 anos (30).

Também tem sido muito comentada a possibilidade dos telemóveis poderem potenciar o aparecimento de tumores cerebrais. Contudo, a evidência não é suficientemente forte, uma vez que as amostras são pequenas e o tempo de seguimento curto. Um exemplo de um estudo que relacionou a utilização de telemóveis com o risco de aparecimento de meningiomas é o de Schuz *et al.* (31). Pelo contrário, o estudo de Lönnet *et al.* não suportou esta tese. Apesar dos vários estudos inconclusivos, esta hipótese continua a ser alvo de atenção (32).

1.2.4.3. Deleção do gene NF2

Outro fator de risco é a eliminação do gene da neurofibromatose tipo 2 (NF2), muitas vezes associada com o braço longo do cromossoma 22q12 (14). O produto do gene NF2 pertence às famílias das proteínas estruturais, como a proteína merlina, especializada na formação da ligação entre a membrana celular e o citoesqueleto de actina (16).

A proteína NF2 é a única supressora de tumor que está associada ao desenvolvimento de meningiomas benignos. No entanto, de acordo com

Wellenreuther *et al.*, a frequência da mutação do gene NF2 varia de acordo com a variante histológica, isto é, a mutação de NF2 ocorre mais frequentemente nos meningiomas fibroblásticos e de transição (70-80%) do que nos meningoteliais (25%), o que sugere uma patogénese molecular distinta nas variantes dos meningiomas (33).

Existem apenas algumas famílias deste gene com suscetibilidade para o aparecimento de meningiomas, mas sem alterações no locus NF2, o que indica uma predisposição genética adicional para estes tumores (16).

1.2.4.4. Recetores hormonais sexuais

Diversas investigações apontam para a existência de recetores das hormonas sexuais na membrana celular dos meningiomas, embora o seu mecanismo continue por explicar. Está demonstrado que aproximadamente dois terços de todos os meningiomas expressam recetores da progesterona na membrana celular, o que poderá potenciar o seu desenvolvimento (14).

Korhonen *et al.* recorreram a 510 amostras tumorais e concluíram que 88% dos meningiomas primários eram positivos para recetores de progesterona, 40% para os de estrogénio e 39% para os de androgénio. Contudo, não observaram qualquer diferença na expressão das hormonas sexuais entre indivíduos do sexo feminino e masculino (34).

Wiemels *et al.*, em 2010 demonstraram que pacientes com meningiomas, aquando períodos com elevados níveis de progesterona, como fase luteínica do ciclo menstrual ou gravidez, tinham um agravamento dos sintomas clínicos. Por outro lado, esses sintomas foram minimizados após terapia de interrupção de agonistas de estrogénio. Estes resultados confirmaram que os meningiomas são dependentes da progesterona (27).

1.2.4.5. Dietas/Alergias

De forma a analisar a influência do sistema imunitário no desenvolvimento de tumores cerebrais, Brenner *et al.* tentaram, em vão, e em oposição aos doentes com gliomas, relacionar alergias e doenças autoimunes com o risco de aparecimento de meningiomas (35). Contrariando este estudo, Schoemaker *et al.* observaram o histórico de alergias em 2 populações e detetaram uma associação inversa entre o risco de meningioma e os referidos históricos. Contudo, admitiram a existência de fatores confundentes ou de viés (36).

1.2.4.6. Outros fatores na patogénese dos meningiomas

Os meningiomas foram ocasionalmente associados a algumas síndromas hereditárias, como as síndromas de Cowden, Gorlin, Li-Fraumeni, Turcot, Von Hippel-Lindau e neoplasia endócrina múltipla do tipo I. Contudo, permanece por explicar se estas associações são casuais (16). De acordo com o estudo de Schneiner *et al.*, este tumor pode estar associado à diabetes *mellitus* ou à hipertensão arterial em indivíduos do género feminino. Por sua vez, a artrite reumatoide demonstra uma associação negativa com a doença (22).

1.2.5. **Tratamento dos meningiomas**

A ressecção cirúrgica é o tratamento de eleição, acompanhado ou não de radioterapia (RT). A decisão de intervir cirurgicamente depende da avaliação de alguns fatores, como a idade do doente, a presença ou ausência de sintomas e a localização e volume do tumor (13).

Após uma ressecção completa, e de acordo com as indicações da OMS, não é recomendado qualquer tratamento complementar, uma vez que a recorrência após 5

anos é inferior a 5% (13,14, 37). A extensão da remoção é classificada de acordo com os critérios propostos por Simpson, em 1957 (tabela 2).

A sobrevida dos doentes depende da extensão da remoção cirúrgica (13).

Tabela 2- Extensão de ressecção cirúrgica nos meningiomas (Graus de Simpson)(13)

Grau	Características
I	Remoção completa do tumor, incluindo a dura-máter e osso
II	Remoção completa do tumor e coagulação da dura-máter
III	Remoção completa do tumor sem a ressecção ou coagulação da dura-máter
IV	Remoção parcial do tumor
V	Apenas biopsia

A RT é utilizada nos casos de ressecção cirúrgica incompleta, e/ou em meningiomas atípicos ou anaplásicos, com um risco elevado de recorrência (14,38). A quimioterapia convencional deve ser considerada apenas em casos de tumores malignos (25,31 – 33).

A radiocirurgia estereotáxica é uma alternativa à cirurgia e à RT, sendo utilizada no tratamento de pequenos e médios meningiomas sintomáticos (<3 cm) e em alguns casos de recorrência (13,42).

Como muitas destas opções terapêuticas podem ser insuficientes, torna-se essencial novos tratamentos, os quais têm tido por base inibidores moleculares de cascatas de sinalização e/ ou drogas anti-angiogénicas (43). O bloqueio dos recetores dos fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) poderá também ser uma opção a considerar, uma vez que os meningiomas são tumores extremamente vasculares que expressam níveis elevados de VEGF (44).

1.2.6. Prognóstico

A maioria dos doentes com meningiomas tem um prognóstico favorável a longo prazo. Dos vários fatores que o determinam, a extensão da ressecção cirúrgica e o grau de anaplasia do tumor são os mais importantes (45).

Numa ressecção parcial, quanto maior o grau de anaplasia, maior a probabilidade de recorrência. Cinco anos após remoção cirúrgica total, a taxa de recorrência é de 3% nos meningiomas benignos, 38% nos atípicos e 78% nos anaplásicos (6). Por outro lado, numa ressecção parcial, a percentagem de recorrência é de 30, 60 e 90% após 5, 10 e 15 anos, respetivamente (14).

De acordo com o grau de anaplasia, a estimativa de sobrevivência após 5 anos é de 70% para os meningiomas benignos, 75% para os atípicos e 55% para os anaplásicos (14).

1.3. Ciclo Celular

As neoplasias são entendidas, de uma forma geral, como o crescimento e proliferação de forma autónoma e descontrolada das células. Assemelham-se às células normais a partir das quais se originaram, mas sem um padrão coordenado de crescimento nem função útil para o seu hospedeiro. Resultam de processos capazes de alterar os mecanismos moleculares envolvidos no controlo da normal proliferação e da diferenciação celular (46).

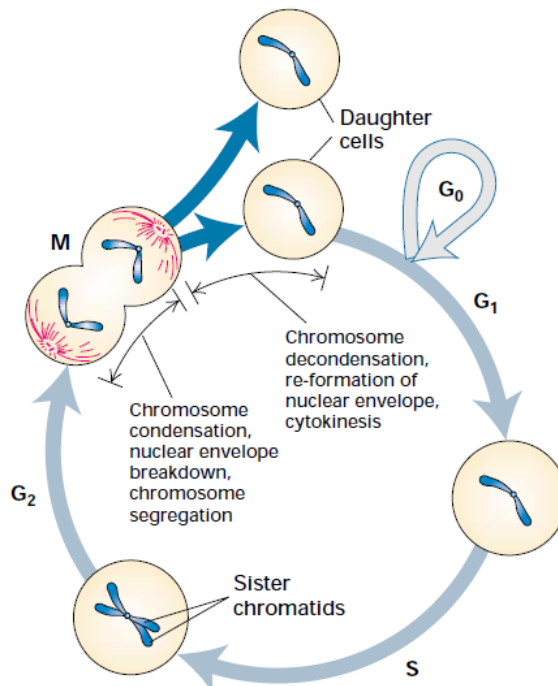


Figura 8- Ciclo Celular

O ciclo celular é um processo complexo que está presente, não só durante o crescimento e proliferação celular, mas também durante a reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN), como resposta a danos celulares e em algumas patologias, como o caso das tumorais (47).

Antes de 1950, os biólogos reconheciam apenas duas fases no ciclo celular visíveis microscopicamente: a mitose (M) e a interfase. Howard e Pelc, utilizando a marcação com ³²P e a autoradiografia, demonstraram que a interfase era dividida em três fases: *Gap1* (G1), síntese de ADN (S) e *Gap2* (G2) (fig. 8) (47 – 50).

A capacidade de proliferação celular de qualquer tumor, incluindo a dos meningiomas, é tanto maior quanto mais elevado for o grau de anaplasia, o qual pode ser avaliado pela quantificação destes dois estádios.

1.3.1. Fases do Ciclo celular

1.3.1.1. Gap 1

A fase G1 é a primeira do ciclo celular. Dura cerca de 9 horas e tem por objetivo preparar a célula para a replicação do ADN. Esta é a fase de regulação mais importante do ciclo celular, uma vez que a célula “decide” se entra em mitose ou permanece na fase quiescente (estadio G0), na qual não se encontra no ciclo celular, mas em potencial divisão celular. Isto explica que em casos de tumores, as proteínas envolvidas na progressão da fase G1 estejam frequentemente mutadas, tornando-as um dos alvos terapêuticos mais atrativos no desenvolvimento de novos agentes para o tratamento de neoplasias (49).

1.3.1.2. Síntese de ADN

Após a célula ter ultrapassado os pontos de restrição, é iniciado o processo de replicação de ADN. Dura, aproximadamente, 10 horas e consiste na duplicação de todo o material genético (49).

1.3.1.3. Gap 2

A fase G2 tem a duração de 4,5 horas e tem como objetivo finalizar a síntese de ADN antes da célula entrar em mitose (49). Além das células continuarem a crescer de forma a duplicarem o seu tamanho, existe, também, síntese de proteínas necessárias para a quebra do invólucro nuclear, condensação dos cromossomas, formação do fuso cromático e outros processos essenciais para a sua entrada no processo de mitose (51).

1.3.1.4. Mitose

A mitose, ou divisão celular, é um processo composto por quatro subfases (profase, metafase, anafase e telofase), no qual uma célula-mãe dá origem a duas células-filhas idênticas (Fig. 9). Normalmente, este estadió demora 30 minutos em células humanas, o que é relativamente rápido tendo em conta a sua complexidade (49).

A mitose é a única fase do ciclo celular que pode ser reconhecida apenas por um exame morfológico, uma vez que as suas características estão bem definidas (52). A avaliação da proliferação celular, através da contagem de mitoses, faz parte dos critérios da OMS para a avaliação do grau de anaplasia dos meningiomas. No entanto, existem alguns problemas inerentes ao uso desta determinação, como seja o de indicador proliferativo, uma vez que a identificação de figuras em mitose pode ser tanto mais difícil quanto a hiper celularidade do tumor, isto é, a sua anaplasia.

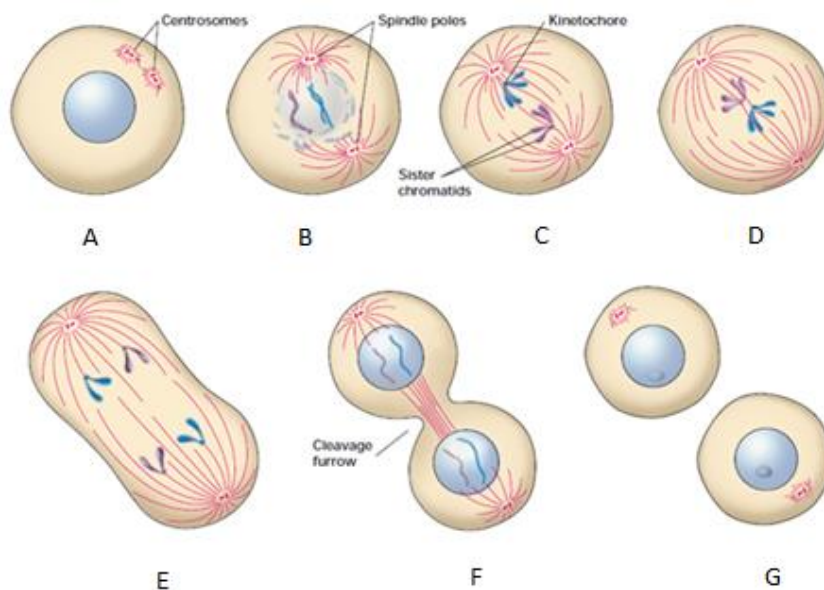


Figura 9 - As várias fases do ciclo celular: (A) Fase G2; (B) Profase; (C) (D) Metáfase; (E) Anafase; (F) Telofase; (G) Fase G1

1.3.2. Regulação do ciclo celular/ Pontos de restrição

Para a manutenção da integridade da célula e do material genético, as fases do ciclo celular têm uma sequência muito bem definida, nas quais a iniciação de cada fase é dependente da conclusão da fase anterior (30). Por exemplo, a replicação de ADN deve estar completa antes da divisão celular começar, de modo a garantir que ambas as células recebam uma cópia completa do genoma. A via de sinalização dos pontos de restrição existe no ciclo celular para manter a ordem e o tempo correto das várias fases, sendo, por isso, considerado como um sensor que tem a capacidade de detetar possíveis erros (48). A maioria dos pontos de restrição não é obrigatória para o progresso do ciclo celular, mas no caso de estes falharem as células perdem a capacidade de limitar e comandar o seu próprio crescimento, iniciando uma divisão descontrolada com, as células a dividirem e a multiplicarem-se muito rapidamente e de forma aleatória (53).

Para entrar em divisão celular, as células recrutam um grupo de proteínas de regulação, as Quinases Dependentes de Ciclina (CDKs). A concentração de CDK aumenta e diminui durante o ciclo celular, sendo regulada especificamente por proteínas da família das ciclinas. A expressão das ciclinas e a sua associação às CDKs permite às células passarem através dos pontos de restrição (47,53).

Os genes mais frequentemente envolvidos no crescimento de neoplasias são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Em células normais, os produtos dos proto-oncogenes atuam em diferentes níveis ao longo das vias que estimulam a proliferação celular. Contudo, em células mutantes podem promover o crescimento tumoral. A inativação de genes supressores de tumores, como o pRb ou o p53, resulta numa disfunção de proteínas que normalmente inibe a progressão do ciclo celular. Em células tumorais têm sido observadas mutações em genes que codificam as CDK, as ciclinas e as enzimas ativadas-CDK (54).

A utilização de anticorpos (acs) contra antigénios (ags) específicos, expressos nas células proliferativas tumorais através do método de imunohistoquímica, permite a análise da proliferação celular (53).

1.4. Anticorpo Ki-67

A proteína Ki-67 é uma imunoglobulina G1 de ratinho, produzida contra a fração nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin (55), originalmente definida como um protótipo do ac monoclonal Ki-67 (56).

O ac foi detetado numa estrutura nuclear presente exclusivamente em células em proliferação. A análise detalhada do ciclo celular revelou que o ag estava presente no núcleo das células nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, ao contrário das células em fase G0 que não o expressaram (57).

1.4.1. Estrutura

O Ki-67 é uma proteína nuclear lábil e não histónica (58). A proteína é expressa pelas células proliferativas durante a fase G1, aumentando o nível de expressão durante as fases S e G2, e obtendo o seu pico na fase M durante a metáfase. É rapidamente catabolizada no final da fase M, tornando-se quase indetetável em G0 e no início de G1. A utilização da técnica de Western Blotting revelou que o Ki-67 reage com dois polipéptidos de 345 e 395 kDa (59).

As diferentes localizações da proteína Ki-67 e a forma como esta proteína se desloca do nucléolo para a região perinuclear durante a mitose têm sido amplamente estudadas (59,60). No entanto, é indiscutível que a proteína Ki-67 tem uma localização muito complexa e específica no núcleo, mas que é alterada durante todo o ciclo celular. Foi sugerido que a proteína Ki-67 estaria inserida num

compartimento designado por “região deficiente de fibrilarina da componente fibrilar densa” (59). Durante a interfase, está localizada sobretudo no nucléolo, não obstante de que em G1 esteja distribuída na região perinuclear, e, em fases posteriores, no interior nuclear (59,61). Durante a mitose, o Ki-67 é redistribuído, encontrando-se presente em todos os cromossomas. Após a quebra da membrana nuclear, pode ser visível no citoplasma (60).

Uma das vantagens da imunomarcação com Ki-67 é a possibilidade de ser utilizada em várias preparações citológicas e histológicas. Em comparação com as contagens de células mitóticas, o índice de Ki-67 é mais sensível, uma vez que todas as células presentes no ciclo celular são reconhecidas (60), evitando o esforço do patologista em identificar células em mitose, o qual, por várias razões, como o plano de corte que está a observar, ou a incorreta identificação do corpo mitótico, poderá não efetuar uma contagem que reflita o verdadeiro índice mitótico do tumor (61).

A grande desvantagem do ac Ki-67 original era não poder ser usado em laboratórios comuns de histopatologia, uma vez que o epítipo reconhecido pelo ac é destruído com a fixação em formol, impossibilitando, assim, a sua utilização em material fixado em formol e incluído em parafina, sendo necessário o recurso a tecidos frescos ou de congelamento rápido (55,60). Esta desvantagem foi ultrapassada pelo desenvolvimento do ac monoclonal equivalente Ki-67 (MIB-1, e MM1) que pode ser usado em cortes em parafina, depois de recuperação antigénica por alta temperatura (31,60,62).

Atualmente, o MIB-1 é o ac mais utilizado, embora existam outros que possam igualmente detetar a epítipo Ki-67, como o MIB-5 (único ac monoclonal reativo em roedores), o TEC-3 e o MM1, que é o ac utilizado neste estudo (58).

1.4.2. Função

A proteína Ki-67 está presente em todas as células em proliferação, tanto nas normais como nas tumorais. Embora o seu papel ainda seja desconhecido, é inquestionável que a sua expressão e proliferação celular estão diretamente ligadas (60,63,64). Para além desta função, e baseado na localização extranuclear durante a fase G1, ela pode, também, ser importante na organização do ADN. Uma outra proposta para o papel da proteína Ki-67 é que esta pode estar associada à síntese de ribossomas durante a divisão celular. Esta observação é suportada pela relação entre: a expressão do Ki-67, a taxa de síntese de proteínas e a função de ribossomas (58).

Uma vez que o ag Ki-67 está presente em todas as células proliferativas, este é um excelente marcador de crescimento tumoral. Por essa razão, acs contra a proteína Ki-67 são utilizados rotineiramente como ferramentas de diagnóstico em várias neoplasias (60).

Enquanto a maioria dos estudos tentam correlacionar a expressão do Ki-67 com o comportamento biológico da neoplasia, outros, com doentes de tumores prostáticos sugerem, que a expressão do Ki-67 também pode ter um papel preditivo, pois o doente poderá ser tratado de acordo o seu nível de expressão (58,65,66).

Em alguns estudos não foi verificada qualquer correlação entre o prognóstico e o índice de Ki-67. Este facto não significa, necessariamente, que a expressão de Ki-67 não seja um bom marcador da atividade proliferativa, mas sim que não há variabilidade do curso da doença, isto é, a presença do ag Ki-67 não indica que a célula se encontre a dividir, uma vez que ela pode deixar o ciclo ativo e entrar numa fase de repouso, sem influenciar a expressão do Ki-67 (60). Apesar da proliferação celular ser parte integrante da função de um tumor, as taxas de morte celular e de células que se encontram na fase G0 também ajudam a prever a progressão do tumor (64).

1.4.3. Ki-67 em meningiomas

Vários estudos mostram que o índice de Ki-67 em meningiomas pode ser utilizado como marcador do seu comportamento biológico pós-operatório, ao fornecer informação adicional sobre o grau de anaplasia tumoral. No entanto, o reduzido número de casos não torna os resultados estatisticamente significativos, além de que os métodos utilizados diferiram entre estudos, o que impossibilita comparações fidedignas (67). Ainda assim, diferentes avaliações estimaram um índice médio de Ki-67 entre 0,9-3,8%, 3,3-9,9% e 8,7-14,7% para meningiomas de grau I, II e III, respectivamente (68).

1.5. Quantificação celular

Para um diagnóstico inequívoco da proliferação celular, independentemente do método utilizado, é importante utilizar indicadores quantitativos.

Alguns autores sugerem a utilização da contagem manual das células tumorais através da utilização do método de imunohistoquímica com os acs respectivos dessas células. No entanto, este é um procedimento moroso, sendo uma alternativa a utilização de um método semi-quantitativo, que tem vindo a ser aplicado com algum sucesso (52).

Na investigação de Słodkowska *et al.* em 2001, as técnicas de análise de imagens foram aplicadas, na quantificação do índice de marcação com Ki-67 nos tumores do SNC (meningiomas e oligodendrogliomas), através de uma contagem automática com o *software Computerized Analysis of Medical Images (CAMI)* (18). Um outro estudo, com recurso à análise de imagens para a determinação quantitativa da proliferação celular, foi desenvolvido pelo Grala *et al.* em 2010. Estes propuseram um modelo que combinava métodos matemáticos com o *software Support Vector Machine (SVM)*. A discrepância entre a contagem manual de núcleos marcados pelo

Ki-67 e a automática não ultrapassou os 14%, o que demonstrou ser uma alternativa válida para a determinação do índice de Ki-67 em meningiomas (68).

No estudo de Nakasu *et al.*, em 2001, os autores avaliaram a previsibilidade de crescimento tumoral e possíveis recorrências em 139 casos de meningiomas através de técnicas de imunohistoquímica com o ac MIB-1 para dois possíveis métodos de contagem: área com maior índice de MIB-1, e área escolhida ao acaso. Foi determinado o índice de MIB-1, sendo que o primeiro obteve o dobro da marcação em relação ao segundo. Ambos os métodos exibiram uma correlação significativa entre o índice de MIB-1 e a velocidade de crescimento ou taxa de recorrência. Apesar de haver uma marcação superior dos núcleos utilizando o primeiro método, foi o segundo que melhor previu o comportamento pós-cirúrgico dos meningiomas. Tais resultados sugerem que as áreas tumorais de acumulação de células MIB-1 positivas podem não refletir esse comportamento clínico (62). A utilização de uma área ao acaso para a contagem de células tem a desvantagem de ser necessário contar um maior número de elementos tumorais para manter a mesma reprodutibilidade em relação ao método oposto (62).

Um estudo de Perry *et al.*, em 1997, mostrou que a hiper celularidade também podia ser um dos critérios possíveis para o diagnóstico da anaplasia histológica dos meningiomas, considerando aumento da densidade celular normal mais de 53 núcleos em HPF (69). Em 2012, num estudo com 196 amostras de meningiomas, Backer-Grøndahl *et al.* concluíram que a densidade celular se correlacionava positivamente com o grau de anaplasia tumoral (19). Porém, em 2010, Akyyildiz *et al.* não observaram qualquer correlação idêntica, numa análise a 245 meningiomas (70).

De acordo com um estudo preliminar realizado no LN do Hospital de Santa Maria, em 2012, com 81 amostras de meningiomas (21 meningoteliais, 18 de transição, 20 fibroblásticos e 22 atípicos), a densidade celular variou entre os diferentes subtipos de meningiomas. Os fibroblásticos obtiveram uma menor densidade, tal como esperado, já que esta variante é relativamente pouco celular; os meningiomas

meningoteliais e atípicos obtiveram, sensivelmente, a mesma, e os de transição foram os que apresentaram maior densidade celular. Para além disto, foi possível verificar que os tumores dos indivíduos de sexo masculino tinham uma densidade celular superior quando comparados com os do sexo feminino. Esta informação foi obtida, apenas para os meningiomas atípicos, uma vez que este foi o único grau de anaplasia com uma amostra suficiente de indivíduos do sexo masculino. Outra conclusão retirada deste estudo foi que os indivíduos mais idosos tinham tendência para um aumento da densidade celular em todos os tipos de meningiomas incluídos. O reduzido número de casos estudados explicou o enviesamento dos resultados, pelo que ficou estabelecida a necessidade de alargar o estudo a uma amostra maior.

Kolles *et al.* demonstraram que o volume médio nuclear em meningiomas podia ser também um importante critério morfométrico na identificação de meningiomas anaplásicos (71).

No seguimento destas investigações, compreende-se a importância do desenvolvimento de um método quantitativo que relacione a densidade celular com os critérios de anaplasia, neste caso incluindo o Ki-67, de modo a contribuir para o conhecimento mais exato do comportamento biológico pós-operatório e refinamento da classificação histológica dos meningiomas.

1.6. *Tissue Microarray*

A técnica de *Tissue Microarray* (TMA) foi descrita pela primeira vez em 1998 por Kononen. Consiste na utilização de um único protocolo de imunomarcagem em vários tecidos em simultâneo (72). Permite que numa única lâmina sejam colocadas diferentes amostras de tecidos, possibilitando poupança de reagentes, redução do tempo técnico, uniformização dos resultados e melhor viabilidade de digitalização e interpretação dos mesmos. A desvantagem reside no facto de exigir uma técnica precisa de um planeamento cuidadoso e controlado, pois cada punção de amostra

apresenta apenas uma fração do tecido que poderá não ser representativa da estrutura e morfologia do tumor (73,74).

O tecido cilíndrico a estudar deve ser retirado através de uma punção no bloco de parafina dador e inserido num novo bloco de parafina, de acordo com as técnicas tradicionais. A área do bloco dador deve ser selecionada com base nas áreas de interesse, previamente marcadas durante uma avaliação microscópica da respetiva lâmina, de modo a otimizar a técnica. Cada bloco de TMA pode originar várias lâminas, e todas elas contêm as amostras na mesma posição (74,75)(Fig. 10).

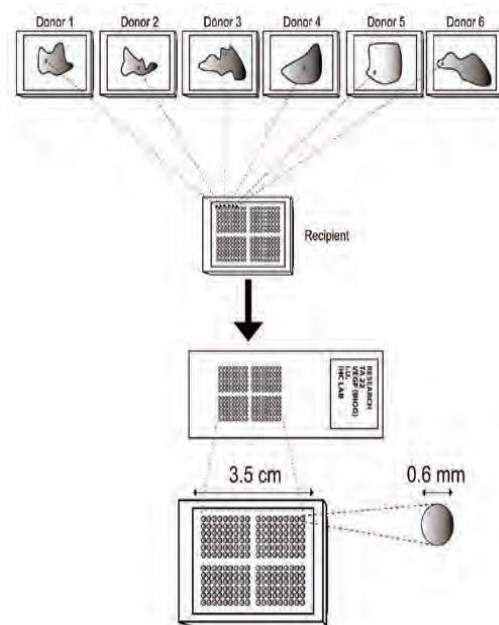


Figura 10 -Construção de um TMA

Os diâmetros da punção, mais utilizados na construção de um TMA, são 0,6mm, 1,0mm, 1,5mm e 2,0mm, sendo o primeiro o *standard*. O tamanho do tecido em análise influencia o número de punções a serem realizadas, pois nos casos de blocos de parafina com pouco tecido tumoral, três punções de 0,6mm podem destruir o bloco dador (74,75).

As lâminas de TMA podem ser analisadas manualmente, ou recorrendo a *softwares* de análise de imagem como o *Whole Slide Image (WSI)* e o *Image J*.

2. Objetivos

Tal como já mencionado, a classificação do grau de anaplasia dos meningiomas da OMS é, em grande parte, subjetiva, pelo que uma avaliação quantitativa, caso do cálculo da sua densidade celular, poderá ser uma ferramenta valiosa na resolução desta dificuldade, e, como resultado, útil na previsão do seu comportamento biológico (18,45).

Assim, os objetivos primários deste estudo são os seguintes:

- a) Quantificar a densidade celular de 250 meningiomas (140 de grau I, 79 de grau II e 31 de grau III) e das variantes mais frequentes do grau I;
- b) Calcular o índice proliferativo, no mesmo grupo de meningiomas, através de uma marcação imunohistoquímica, com o ac Ki-67;
- c) Estabelecer eventual relação entre os indicadores quantitativos (densidade celular e índice proliferativo) e o grau de anaplasia, incluindo variantes de grau I.

Os objetivos secundários são:

- a) Identificar pontes de corte para os indicadores quantitativos de maneira a poderem ser utilizados na previsão do comportamento biológico pós-operatório dos meningiomas;
- b) Analisar a relação entre os indicadores quantitativos e as variáveis clínicas: idade e sexo.

3. Materiais e Métodos

Foi realizado um estudo retrospectivo constituído por uma amostra de 250 meningiomas operados entre 2000 e 2012 no Serviço de Neurocirurgia do Hospital de Santa Maria (CHLN) e diagnosticados no Laboratório de Neuropatologia (LN). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa no dia 18 de Março de 2014.

3.1. Dados clínicos e classificação histopatológica

Os meningiomas foram diagnosticados, de acordo com a Classificação dos Tumores do SNC da OMS, de 2007, nos de grau I (meningoteliais, fibroblásticos e de transição), grau II (atípicos) e grau III (anaplásicos). Os atípicos são definidos por invasão do parênquima cerebral, hiper celularidade, núcleos proeminentes, pleomorfismo e hipercromasia nucleares, necrose e aumento do índice mitótico (> 4mitoses/10HPF). Os meningiomas anaplásicos são caracterizados por uma perda das estruturas histomorfológicas habituais e por um elevado índice mitótico (> 20mitoses/10HPF).

Foram seleccionados apenas casos cuja disponibilidade de material biológico tanto permitisse recolher amostras para a realização deste estudo, como mantivesse tecido de reserva suficiente para não inviabilizar eventuais revisões do diagnóstico.

A informação clínica e neuropatológica dos doentes (idade, sexo, localização e grau de anaplasia) foi recolhida através da consulta dos processos neuropatológicos correspondentes, arquivados no LN. Foi apenas utilizado o número de registo do caso e não o nome do doente e os resultados foram tratados por grupos de patologias, a fim de garantir os pressupostos de confidencialidade.

3.2. Tissue Microarray

As lâminas com espessura de 3 μ m, impregnadas em parafina, com o tecido proveniente das cirurgias dos meningiomas, estavam previamente coradas pelo método de hematoxilina-eosina, rotineiramente utilizado. Através de uma avaliação microscópica, procurou-se um campo considerado típico do diagnóstico histológico tumoral, o qual foi comparado com o bloco de parafina correspondente, selecionando-se a área da punção. As amostras cilíndricas obtidas, com diâmetro de 3mm, foram utilizadas para preparar blocos de TMA impregnados em parafina pelas técnicas estabelecidas no laboratório de neuropatologia.

3.3. Imunohistoquímica

Estabeleceu-se o índice proliferativo de cada tumor recorrendo à marcação imunohistoquímica das lâminas de TMA com o ac comercial Ki-67 (MM1) na diluição de 1/100 (ver anexo I).

As imunomarcações foram realizadas nos cortes histológicos dos TMAs colocados em lâminas adesivadas *normax superfrost*. Considerou-se marcação positiva quando as zonas-alvo das células (núcleo, citoplasma ou membrana citoplasmática) surgiram coradas de castanho-escuro pela ação da peroxidase sobre o revelador 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Fig. 11).

3.3.1. Protocolo de Imunohistoquímica

1. Desparafinização dos cortes histológicos em xilol durante dez minutos;
2. Rehidratação dos cortes com passagens em álcool etílico com graduação decrescente (100% - 95% - 70%);

3. Inibição da peroxidase endógena através de incubação na solução de bloqueio da peroxidase endógena (200mL de água destilada adicionados a 6mL de H₂O₂ a 33% p/v), em agitação constante e durante 15 minutos;
4. Lavagem em água corrente (três vezes durante 5 minutos);
5. Recuperação antigénica pela técnica de micro-ondas, 600watts durante 10 minutos e 850 watts durante 25 minutos com imersão em tampão citrato (1.000mL de água destilada em 9,375mL de solução antigénica);
6. Lavagem com Tampão Fosfato-Alcalino (PBS);
7. Preparação do anticorpo primário com uma diluição de 1:100 (ac MM1 diluído em Albumina Sérica Bovina (BSA) 1%). Colocação de 250µL em cada corte. Incubação do anticorpo primário *overnight* a 4°C;
8. Lavagem em PBS (quatro vezes durante 5 minutos);
9. Incubação com o anticorpo secundário (comercial) durante 1 hora a temperatura ambiente;
10. Lavagem com PBS;
11. Revelação com o marcador DAB (diluição de 1:50) durante 3 minutos;
12. Lavagem com PBS;
13. Coloração com hematoxilina-eosina durante 10 segundos;
14. Lavagem com água corrente (três vezes);
15. Lavagem com álcool clorídrico;
16. Lavagem em água amoniacal 1%;
17. Desidratação dos cortes com passagens em álcool etílico com graduação crescente (70% - 95% - 100%);

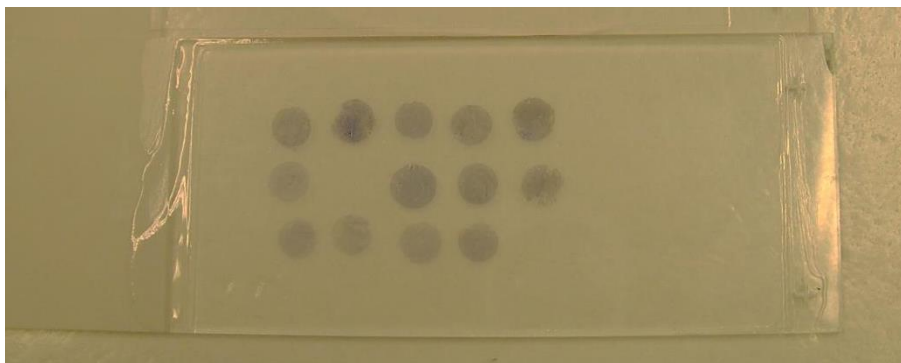


Figura 11 - TMA após imunomarcação com Ki-67

18. Passagem por xilol;
19. Montagem em resina sintética (Entellan).

3.3.2. Análise quantitativa da expressão do Ki-67 e da densidade celular

A seleção das imagens foi feita com o microscópio ótico e a contagem das células a partir de fotografias digitais obtidas com ampliação de 400x através de uma câmara fotográfica Leica *fireCam* incorporada no microscópio Leica DM 2500. Foram tiradas quatro fotografias de cada caso, correspondentes a quatro campos diferentes escolhidos ao acaso, de forma a evitar a sobreposição de campos e, conseqüentemente, a contagem das mesmas células em fotografias distintas.

A contagem respetiva foi realizada automaticamente pelo software *NIH - ImageJ Image Processing and Analysis in Java*. A autora deste trabalho foi responsável por todas as contagens, de forma a uniformizar a técnica e os critérios da mesma, evitando diferenças inter-operadores. O registo foi efetuado em folha de cálculo com recurso ao programa *Excel 2010 do Microsoft Office*.

A utilização do *ImageJ* permitiu converter o tecido visualizado no microscópio em imagens binárias de 8 bit, que foram processadas para remover o ruído de fundo. A separação de cores foi concluída pelo *plugin Colour Deconvolution H DAB* e a separação das células adjacentes pela ferramenta *threshold*, que possibilita a contagem de cada núcleo individualmente. Os valores de *threshold* variaram entre 196 e 230, dependendo da fotografia; no entanto, foi mantido o mesmo valor nas quatro fotografias de cada caso. A contagem de células foi realizada pelo *plugin ITCN: Image – based Tool for Counting Nuclei*, sendo 20 pixels o valor de largura utilizado.

O índice proliferativo do Ki-67, em percentagem, foi calculado através da razão entre o número de núcleos marcados pelo Ki-67 e o número total de células existentes em

determinado campo. O valor da densidade celular foi definido como sendo o número de células em 100µm².

Foi calculado o tamanho nuclear de todos os graus de anaplasia e variantes do grau I para poder servir de controlo ao cálculo da densidade celular. Para a determinação do tamanho nuclear, foi utilizado o *plugin Nucleus Counter* nas condições referidas na Tabela 3:

Tabela 3- Condições para a determinação do tamanho nuclear com plugin *Nucleus Counter*

Parâmetros	Valores
Tamanho da partícula menor	2µm
Tamanho da partícula maior	50µm
Método de <i>threshold</i>	Automático
Método de <i>smooth</i>	Media 5x5

3.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software R* (versão 3.0.2).

Para a análise das variâncias foi utilizado o teste paramétrico ANOVA, uma vez que a homogeneidade das variáveis (índice de Ki-67 e densidade celular) em função do diagnóstico histológico ficou provada através dos resultados do teste de Levene, em que $p\text{-value} > 0,05$ (Tabela 4).

Tabela 4- Teste de Levene para as variáveis em estudo em função do diagnóstico histológico

Teste de Levene (mediana)	<i>p-value</i>
Índice Proliferativo (Ki-67)	0,0641
Densidade Celular	0,196

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para verificar a relação entre expressão de Ki-67 e densidade celular com o sexo dos indivíduos incluídos na amostra, uma vez que o teste de Levene foi inferior ao nível de significância de 0,05 em pelo menos uma das variáveis (Tabela 4).

Tabela 5- Teste de Levene para as variáveis em estudo em função do sexo dos doentes

Teste de Levene (mediana)	<i>p-value</i>
Índice Proliferativo (Ki-67)	0,0332
Densidade Celular	0,168

Foi utilizado o teste de *Tukey* (*Tukey significant difference*) para comparações múltiplas dos graus de anaplasia e variantes do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição).

Para averiguar os poderes preditivos das variáveis (índice proliferativo e densidade celular) na avaliação da anaplasia dos meningiomas foi utilizada a curva ROC (Sensibilidade/1-Especificidade). A análise da área abaixo da curva AUC (*area under the curve*) quantificou o poder estatístico do teste.

A distribuição da expressão de Ki-67 e densidade celular nos graus de anaplasia e variantes do grau I foi calculada para os pontos de corte obtidos pela curva ROC, com o *p-value* determinado pelo teste do chi-quadrado.

4. Resultados

O gráfico 1 e a tabela 6 mostram a casuística anual de todos os meningiomas diagnosticados no LN do HSM (CHLN) entre o período de 2000-2011.

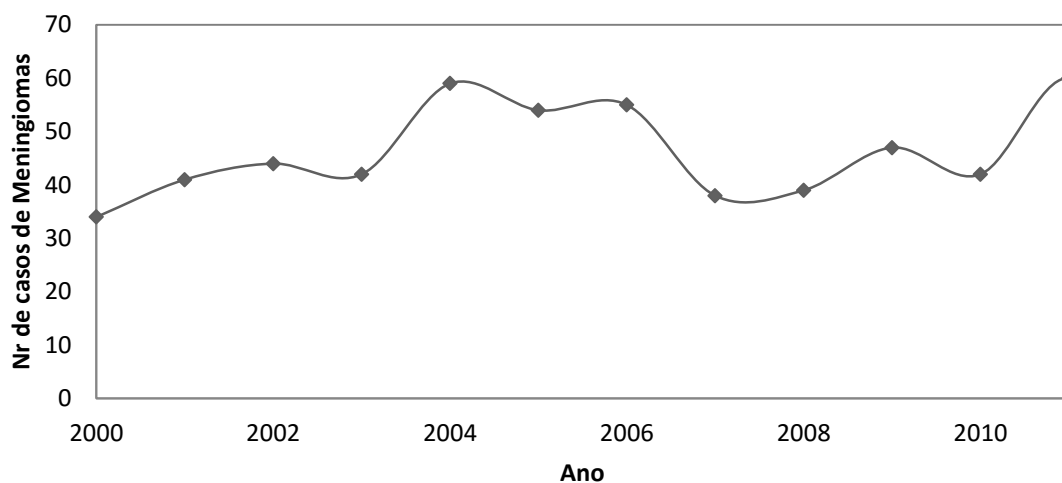


Gráfico 1- Meningiomas diagnosticados no LN do HSM (CHLM)

Tabela 6 - Meningiomas diagnosticados no LN do HSM (CHLM)

Ano	Meningiomas diagnosticados no LN do HSM
2011	60
2010	42
2009	47
2008	39
2007	38
2006	5
2005	54
2004	59
2003	42
2002	44
2001	41
2000	34

4.1. Características da amostra

Neste estudo foram incluídos 250 doentes, 162 do sexo feminino (65,06%) e 87 do masculino (34,94%), sendo o rácio 1,86:1. A percentagem dos graus de anaplasia incluídos foi a seguinte: 56% (n=140) meningiomas benignos, 31,6% (n=79) atípicos e 12,4% (n=31) anaplásicos. A percentagem de variantes de grau I foi de 16,4% (n=41) para meningiomas fibroblásticos, 20,8% (n=52) para os meningoteliais e 18,8% (n=47) para os de transição (tabela 7).

A percentagem de indivíduos do sexo masculino incluídos no estudo foi de 45% (n=14) para os meningiomas anaplásicos e 46,8% (n=37) sendo estes os graus com maior equilíbrio numérico entre géneros. A variante fibroblástica compreendeu 14,6% (n=6) de indivíduos do sexo masculino, enquanto a meningotelial 38,5% (n=52) e a de transição 21,3% (n=10) (tabela 7). A análise estatística demonstrou haver uma correlação significativa entre o sexo dos doentes e o grau de anaplasia ($p=0,001$)

Tabela 7 – Percentagem de doentes incluídos em relação ao sexo e respetiva relação com o grau de anaplasia e variantes do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição)

Diagnóstico Histológico	Sexo		Frequência	Percentagem (%)
	F	M		
Anaplásico	17	14	31	12,4
Atípico	42	37	79	31,6
Fibroblástico	35	6	41	16,4
Meningotelial	32	20	52	20,8
Transição	37	10	47	18,8
Total	163	87	250	100

A idade dos doentes variou entre 3 e 87 anos (media 72). A média de idades dos doentes do sexo feminino foi de 58 anos (3 a 87), e dos masculinos foi de 59,4 anos (13 a 84). A média e mediana das idades dos doentes em relação aos vários graus de anaplasia e variantes do grau I estão representados na tabela 8 e no gráfico 2. Não houve correlação significativa entre a idade do paciente e o grau de anaplasia ($p\text{-value}=0,301$).

Tabela 8- Média e mediana das idades nos vários graus de anaplasia e variantes do grau I (meningotelial, fibroblástico, transição)

Diagnóstico Histológico	Média	Mediana
Anaplásico	57,0±16,3	62,0
Atípico	60,8±15,1	63,0
Fibroblástico	58,8±15,2	61,0
Meningotelial	58,7±14,9	58,5
Transição	54,8±15,3	55,0

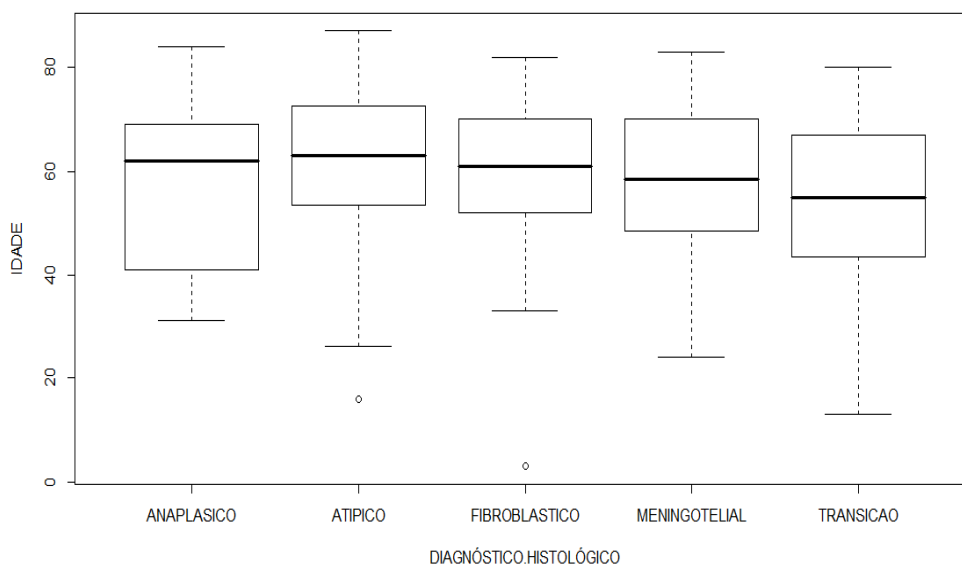
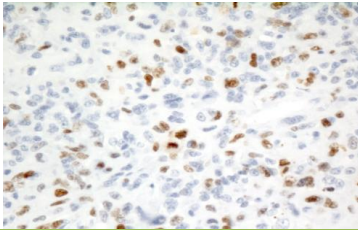
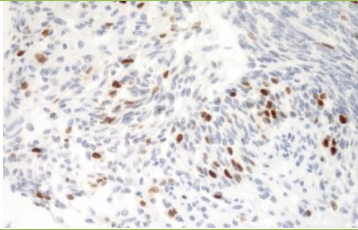
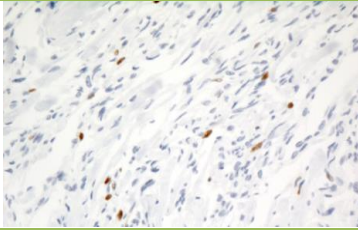
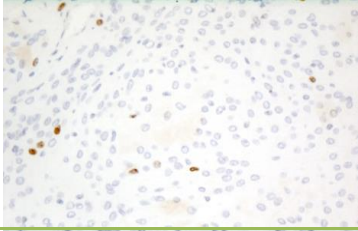
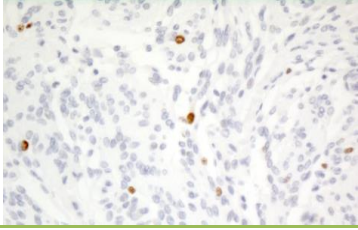


Gráfico 2 – Média de idades entre os diferentes graus de anaplasia e variantes do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição)

4.2. Índice proliferativo em meningiomas

Os meningiomas são tumores muito celulares e têm uma histopatologia heterogênea. Na tabela 9 estão representados exemplos de cada grau de anaplasia e variantes do grau I da amostra em estudo com o respectivo índice proliferativo (ac Ki-67).

Tabela 9—Índice proliferativo (Ki-67) (núcleos castanhos-escuros) nos meningiomas anaplásicos (grau III), atípicos (grau II) e fibroblásticos, meningoteliais e transição (grau I)

Meningiomas	Imunohistoquímica com Ki-67	Média do índice proliferativo
Anaplásico		3,85%
Atípico		2,70%
Fibroblástico		1,04%
Meningotelial		2,23%
Transição		2,01%

4.3. Índice proliferativo (Ki-67)

Para o controlo das contagens automáticas, obtidas pelo *software Image J*, realizou-se uma contagem manual de 15 casos seleccionados aleatoriamente. O erro calculado através da fórmula: $\frac{(\text{Valor aproximado} - \text{Valor exato})}{\text{Valor exato}}$ foi de 3,61% (figura 12).

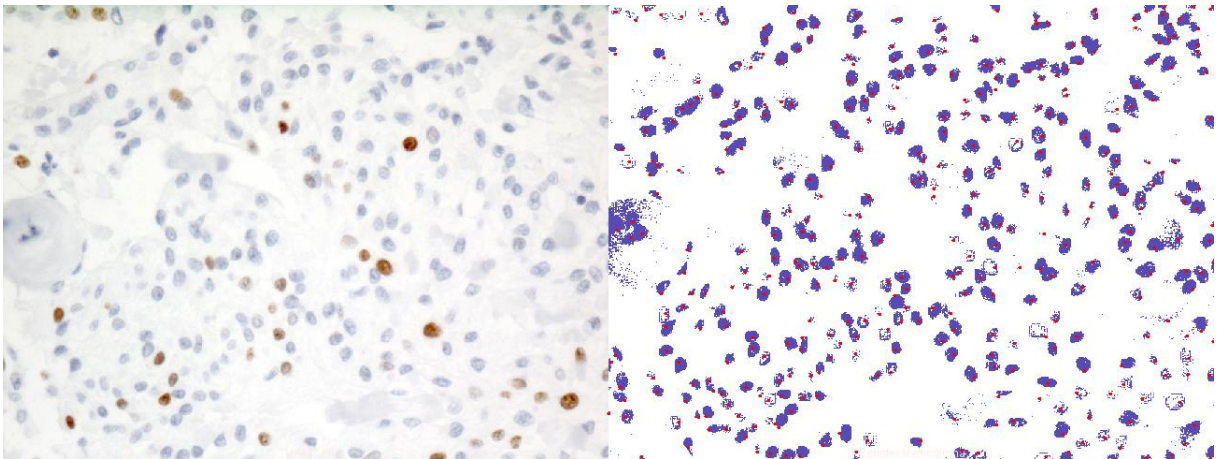


Figura 12 - Imagem digital do campo microscópio demonstrando os núcleos imunorreativos (núcleos a castanho) de um meningioma anaplásico, antes (esquerda) e depois (direita) ter sido avaliado pelo *software Image J*.

O valor do índice proliferativo foi calculado através do valor médio de Ki-67, obtido pela contagem de células Ki-67 imunopositivas de cada tumor. Os resultados para os três graus de anaplasia e variantes do grau I dos meningiomas estão representados nos gráficos 3 e 4.

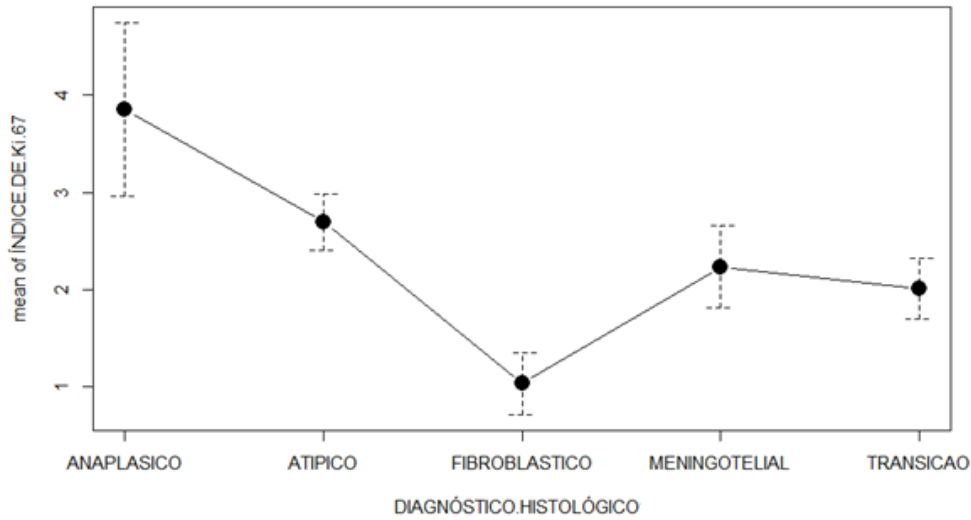


Gráfico 3- Média do índice proliferativo (Ki-67) em função do grau de anaplasia e variantes de grau I (fibroblástico, meningotelial e transição)

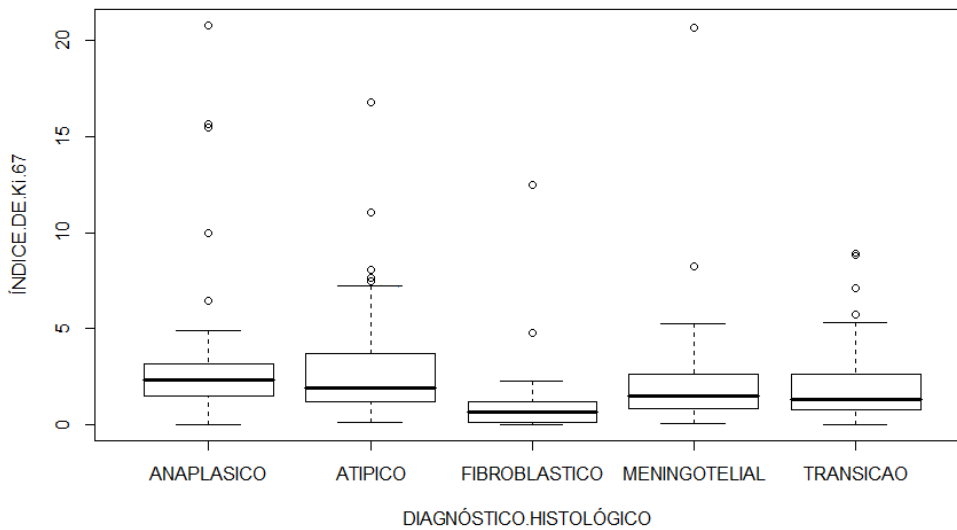


Gráfico 4- Índice proliferativo (Ki-67) para cada grau de anaplasia e variantes de grau I (fibroblástico, meningotelial e transição)

De acordo com o gráfico 4, a média de percentagem de núcleos Ki-67 imunopositivos foi: $3,85 \pm 4,97$ para os meningiomas anaplásicos, de $2,70 \pm 2,60$ para os atípicos, $1,04 \pm 2,04$ para os fibroblásticos, $2,23 \pm 3,04$ para os meningoteliais e $2,01 \pm 2,15$ para os de transição ($p=0,001$).

Resultados I Quantificação celular em meningioma

Tabela 10- Comparação dos valores médios do índice proliferativo (Ki-67) para cada grau de anaplasia e variante do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição)

Grau Histológico	Média	Mediana
Anaplásico	3,85±4,97	2,28
Atípico	2,70±2,60	1,86
Fibroblástico	1,04± 2,04	0,630
Meningotelial	2,23±3,04	1,46
Transição	2,01±2,15	1,27

A mediana do índice proliferativo foi de 2,28% para os meningiomas anaplásicos, de 1,86% para os atípicos, de 0,630% para os fibroblásticos, de 1,46% para meningoteliais e de 1,27% para os de transição (tabela 10).

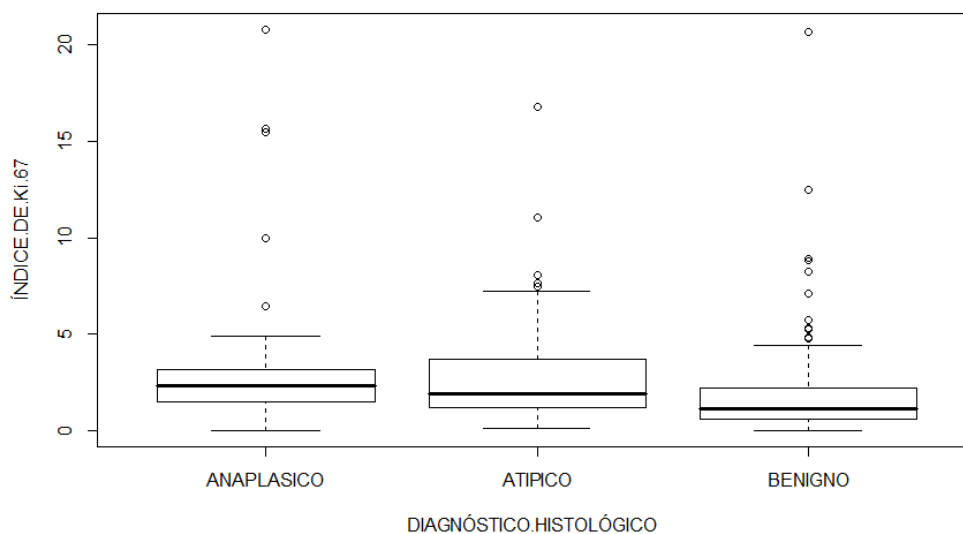


Gráfico 5- Índice proliferativo (Ki-67) para os graus de anaplasia I, II e III

Quando agrupados, os meningiomas benignos num único grupo (grau I), a média da percentagem do índice proliferativo foi de 1,81±2,52 (gráfico 5).

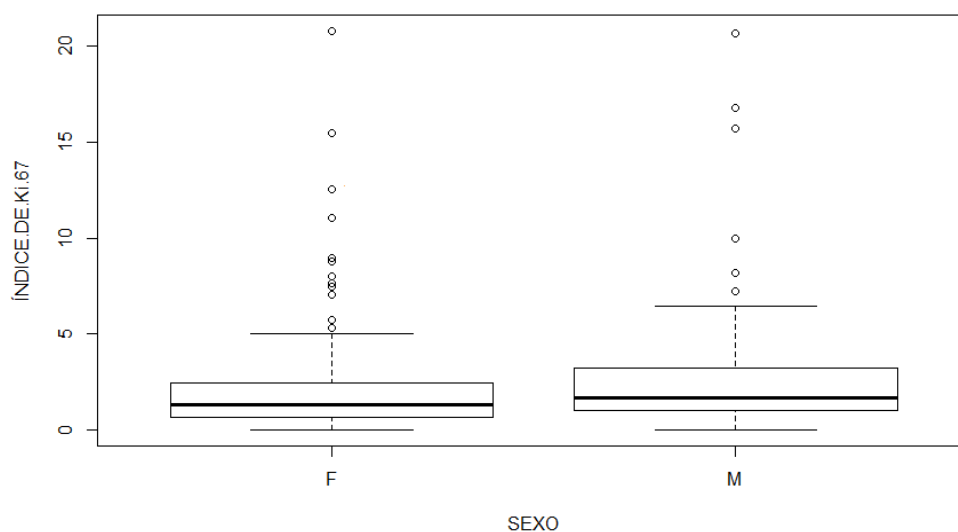


Gráfico 6 – Relação entre o índice proliferativo (Ki-67) e o sexo dos doentes

De acordo com o gráfico 6, a média das percentagens de células Ki-67 imunopositivas foi de $2,12 \pm 2,76$ para indivíduos do sexo feminino e de $2,75 \pm 3,43$ para os do masculino ($p = 0,03$).

Foi possível verificar nos gráficos 4 e 5 que existem muitos *outliers* para a técnica de imunohistoquímica com o Ki-67 (clone MM1), o que pode ser explicado pela variabilidade desta técnica, ou pela natureza das células tumorais, sendo uma das razões pela sua não utilização no diagnóstico de anaplasia dos meningiomas. Esses *outliers* são independentes do sexo do doente (gráfico 6).

Resultados I Quantificação celular em meningioma

Tabela 11-p-value obtidos no teste de *Tukey* para comparações múltiplas dos graus de anaplasia e variantes do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição) em relação ao índice proliferativo

Comparação Múltipla das Médias (Índice Ki-67)	p-value
Anaplásico - Atípico	0,342
Anaplásico - Fibroblástico	<0,001
Anaplásico - Meningotelial	0,111
Anaplásico - Transição	0,050
Atípico - Fibroblástico	0,030
Atípico - Meningotelial	0,903
Atípico - Transição	0,713
Fibroblástico - Meningotelial	0,289
Fibroblástico - Transição	0,523
Meningotelial - Transição	0,996

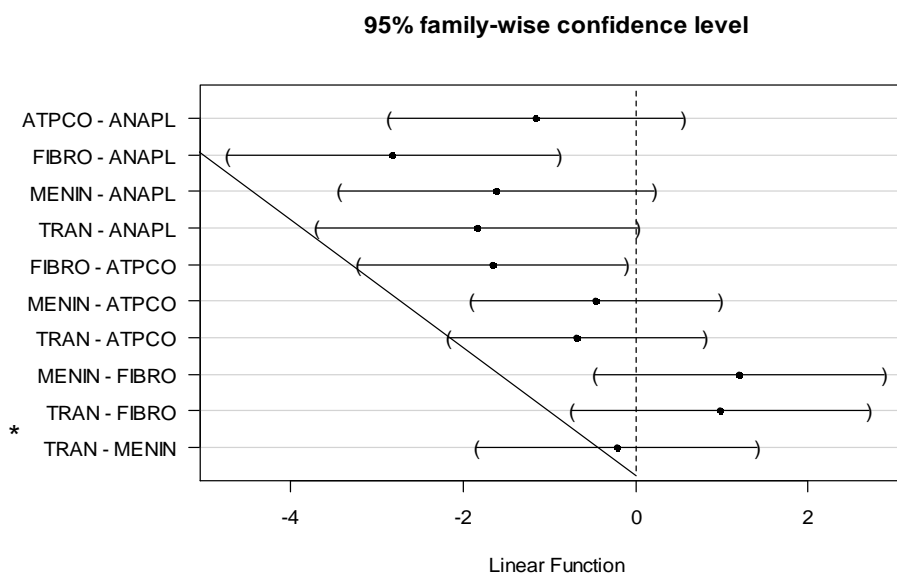


Gráfico 7- Comparação múltipla dos diferentes graus de anaplasia e variantes do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição) em relação ao índice proliferativo pelo Contraste *Tukey*

As diferenças da média do índice proliferativo entre as variantes histológicas de grau I e os graus II e III foram calculadas através de uma análise post-hoc de *Tukey*. Verificou-se existirem diferenças significativas do índice proliferativo entre os meningiomas atípicos e os fibroblásticos ($p < 0,002$) e entre os anaplásicos e os fibroblásticos ($p = 0,03$) (tabela 11 e gráfico 7).

4.4. Densidade Celular

A contagem da densidade celular foi calculada através do *image J* e contabilizou o número de células tumorais em cada $100\mu\text{m}^2$.

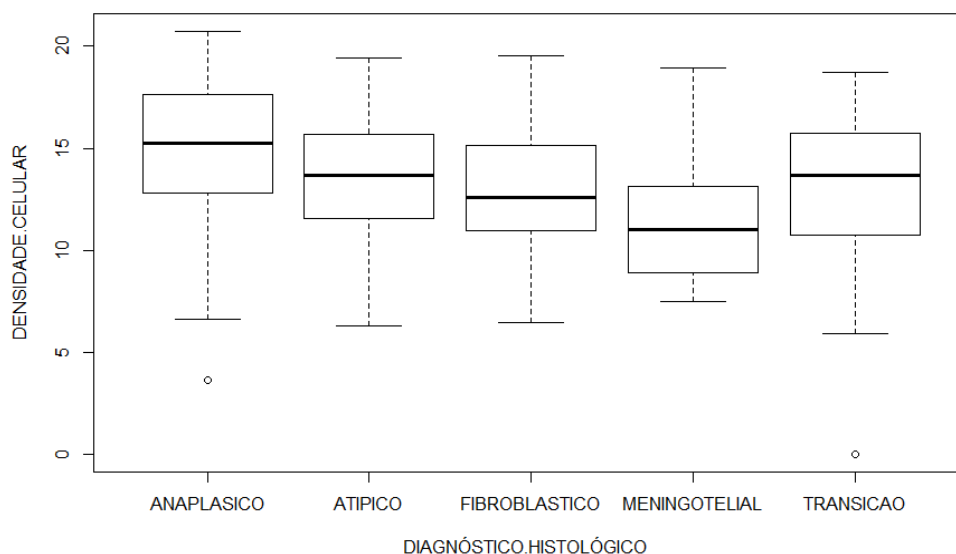


Gráfico 8 – Densidade celular para cada grau de anaplasia e variantes de grau I

De acordo com o gráfico 8, a média das densidades celulares (células/ $100\mu\text{m}^2$) foi de $14,8 \pm 3,68$ para os meningiomas anaplásicos, $13,5 \pm 2,80$ para os atípicos, $13,1 \pm 3,10$ para os fibroblásticos, $11,5 \pm 2,93$ para os meningoteliais e $12,6 \pm 4,27$ para os de transição ($p < 0,0001$).

Resultados I Quantificação celular em meningioma

Tabela 12- Comparação dos valores médios da densidade celular para cada grau de anaplasia variantes do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição)

Grau Histológico	Média	Mediana
Anaplásico	14,8 ± 3,68	15,3
Atípico	13,5± 2,80	13,7
Fibroblástico	13,1± 3,10	12,6
Meningotelial	11,5±2,93	11,0
Transição	12,6±4,27	13,7

A mediana das densidades celulares foi de 15,3 para os meningiomas anaplásicos, de 13,7 para os atípicos, de 12,6 para os fibroblásticos, de 11,0 para os meningoteliais e de 13,7 para os de transição (tabela 12).

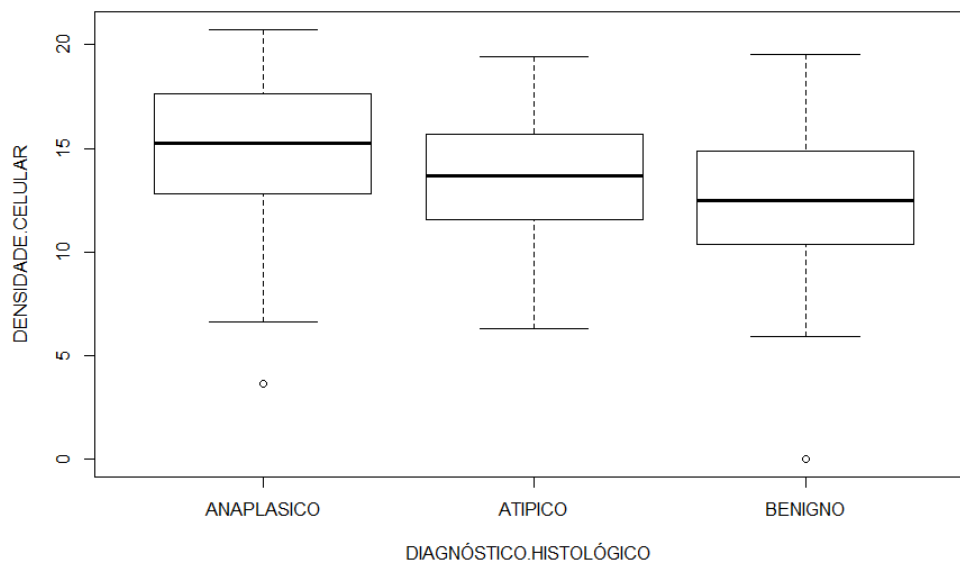


Gráfico 9- Densidade celular para os graus de anaplasia I, II e III

Quando agrupados todos os meningiomas benignos no grupo dos de grau I, a média da densidade celular foi de $12,5 \pm 3,52$ (gráfico 9).

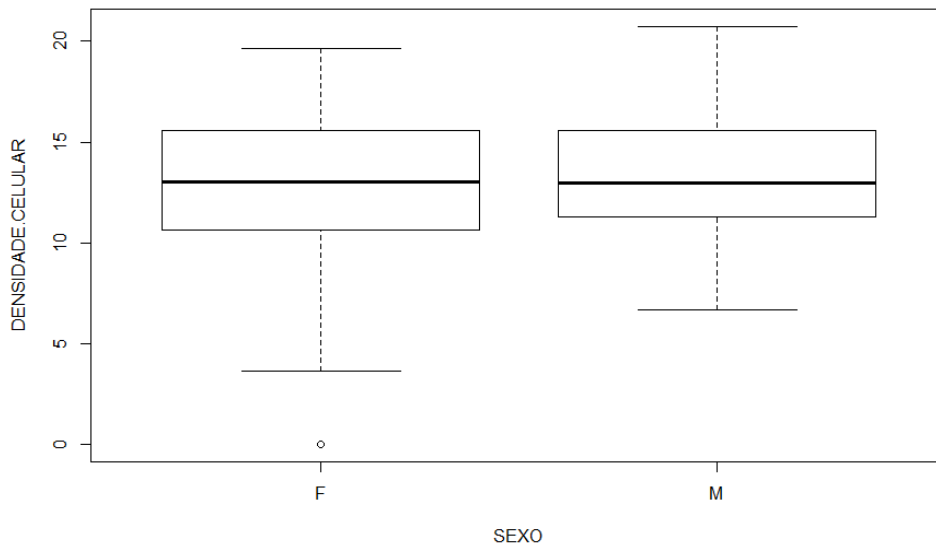


Gráfico 10- Relação entre a densidade celular e o sexo dos doentes

A média da densidade celular foi de $12,9 \pm 3,67$ para indivíduos do sexo feminino e de $13,2 \pm 2,93$ para os do masculino ($p = 0,833$) (gráfico 10).

Tabela 13- *p-value* obtidos no teste de Tukey, para comparações múltiplas dos graus de anaplasia e variantes do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição) em relação à densidade celular

Comparação Múltipla das Medias (Densidade Celular)	<i>p-value</i>
Anaplásico - Atípico	0,313
Anaplásico - Fibroblástico	0,184
Anaplásico - Meningotelial	<0,001
Anaplásico - Transição	0,0370
Atípico - Fibroblástico	0,973
Atípico - Meningotelial	0,008
Atípico - Transição	0,628
Fibroblástico - Meningotelial	0,145
Fibroblástico - Transição	0,965
Meningotelial - Transição	0,433

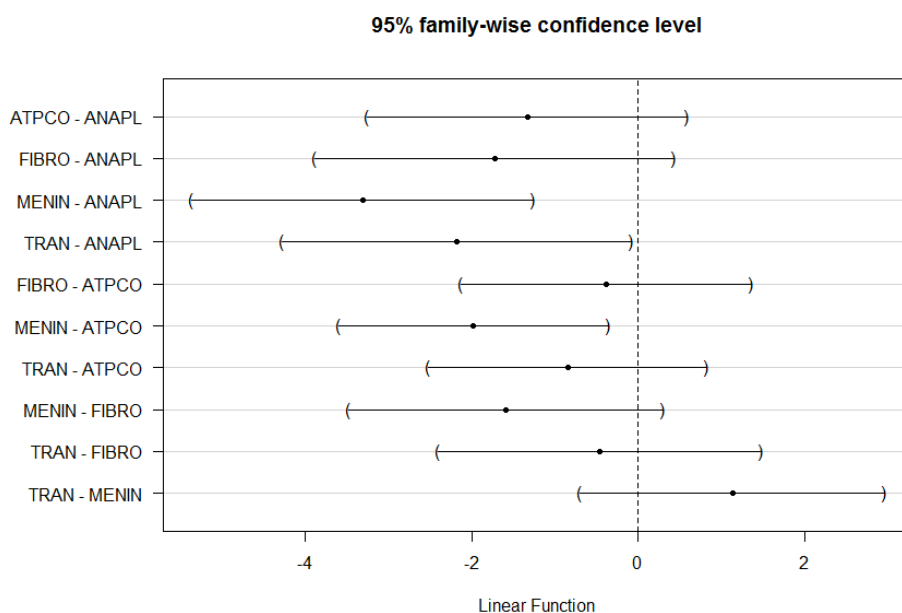


Gráfico 11- Comparação múltipla dos diferentes graus de anaplasia e variantes do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição) em relação à densidade celular através do contraste de *Tukey*

As diferenças da média da densidade celular entre as variantes histológicas dos meningiomas de grau I e os graus II e III foram calculadas através de uma análise post-hoc de *Tukey*. Foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas da densidade celular entre os meningiomas anaplásicos e os meningoteliais ($p < 0,001$) (tabela 13 e gráfico 11).

4.5. Curvas ROC

O ponto de corte do índice proliferativo e da densidade celular foi calculado através da análise das curvas ROC, sendo os meningiomas divididos em dois grupos de acordo com o seu diagnóstico histológico (anaplásicos vs atípicos e benignos).

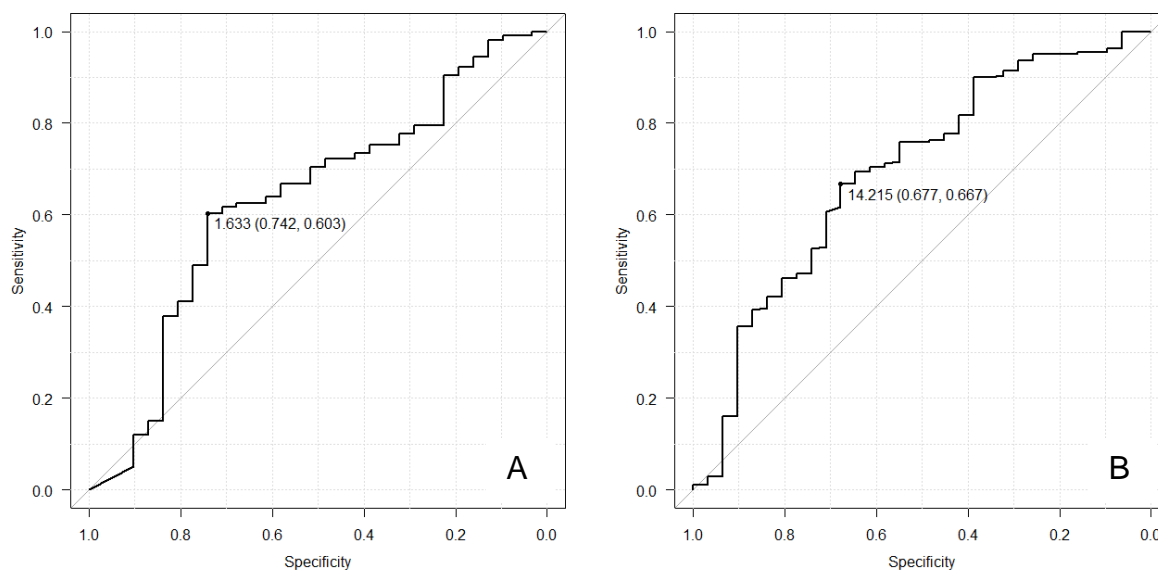


Gráfico 12- Curva ROC: A) índice proliferativo e B) densidade celular

O ponto de corte ótimo para o índice proliferativo foi de 1,63%, com sensibilidade de 74,2% e especificidade de 60,3% (AUC de 0,631 e 95% CI: 0,5202-0,741) (gráfico 12A).

O ponto de corte ótimo para a densidade celular foi de 14.2 célula/100 μm^2 , com sensibilidade de 67,7% e especificidade de 66,7% (AUC de 0,692 e 95% CI: 0,587 – 0,798) (gráfico 12B).

4.6. Expressão das variáveis quantitativas

A distribuição da expressão do Ki-67 e densidade celular nos graus de anaplasia e variantes do grau I foi calculada para os valores obtidos na análise das curvas ROC: <1,63 e $\geq 1,63$ e <14,2 e $\geq 14,2$, respetivamente.

Resultados I Quantificação celular em meningioma

Tabela 14 -Distribuição da expressão de Ki-67 e densidade celular nos três graus de anaplasia e variantes do grau I (fibroblástico, meningotelial e transição)

	Anaplásico	Atípico	Fibroblástico	Meningotelial	Transição	<i>p-value</i>
KI-67 <1,63	8 (25,8%)	34 (43,0%)	37 (90,2%)	30 (57,7%)	30 (63,8%)	<0,0001
KI-67 ≥ 1,63	23 (74,2%)	45 (57,0%)	4 (9,7%)	22 (42,3%)	17 (36,2%)	
Densidade < 14,2	10 (32,2%)	46 (58,2%)	28(68,3%)	42(80,8%)	26(55,3%)	<0,001
Densidade ≥ 14,2	21 (67,7%)	33 (41,8%)	13(31,7%)	10(19,2%)	21(44,7%)	

Foi obtida uma correlação significativa entre a expressão do Ki-67 e o grau de anaplasia dos meningiomas, considerando as variantes do grau I ($p < 0,0001$). A variante com um valor de expressão de Ki-67 superior foi a meningotelial (tabela 13).

A distribuição da densidade celular foi estatisticamente significativa com o grau de anaplasia dos meningiomas, considerando as variantes do grau I ($p < 0,001$). A variante com um valor de expressão superior de densidade celular foi a fibroblástico.

5. Discussão

É fatual que o comportamento biológico pós-operatório dos meningiomas, para a mesma extensão de ressecção cirúrgica, varia na razão direta do seu grau de anaplasia histológica. No entanto, muitos dos seus critérios de anaplasia são subjetivos, daí a possibilidade de ocorrência de comportamentos imprevistos, e a necessidade de procurar medidas objetivas para obstar a este facto (76). No presente estudo, propôs-se inferir acerca do prognóstico dos meningiomas com base na quantificação celular, avaliando, deste modo, a densidade celular em relação às variantes anaplásicas definidas pela OMS e a um critério subjetivo, a medição do índice proliferativo, não fazendo parte dessa definição.

5.1. Variáveis Clínicas

Estudos prévios sugerem que parâmetros demográficos, como a idade de diagnóstico, influenciam o prognóstico dos meningiomas dado as mais jovens poderem corresponder aos de maior grau de anaplasia (76). A mediana de idades nos nossos casos foi a expectável, de acordo com a revisão bibliográfica (22,69), uma vez que este tipo de tumores afetou sobretudo indivíduos entre os 60-70 anos.

A ocorrência da totalidade dos meningiomas da nossa amostra foi mais comum em indivíduos do sexo feminino (2:1), o que está de acordo com o conhecido anteriormente (16,19,67). No entanto, no grupo dos meningiomas fibroblásticos, grau I, os indivíduos do sexo feminino foram 5,83 vezes mais frequentes afetados do que os do masculino. Para os graus de anaplasia superiores, II e III, a frequência entre os dois sexos foi semelhante.

5.2. Índice proliferativo

No nosso estudo, o erro da contagem automática foi inferior a 5%, e como tal a utilização do *image J* é uma alternativa fiável ao método *standard* de contagem manual para obtenção dos índices proliferativos dos meningiomas.

Confirmámos, também, a importância e utilidade da determinação do índice proliferativo, para o diagnóstico/prognóstico dos meningiomas, dada a sua correlação com o grau de anaplasia. No entanto, em todas as contagens foi observada uma diminuição do índice proliferativo (Ki-67) em comparação com a literatura existente (67,77). Estes resultados podem ser explicados pela utilização dos TMAs, pois, e ainda que para a sua constituição tivessem sido escolhidas as áreas visualmente de elevada proliferação e que se tentou se uniforme mais celulares das amostras, estas poderão não ter correspondido às áreas com maiores índices proliferativos, tal como já sugerido (77). Contudo, e de acordo com Nakasu *et al.*, o índice proliferativo não parece ser influenciado pela escolha das áreas, o que suporta a fidedignidade dos resultados obtidos (62). O ac utilizado poderá ser um fator importante, e a imunomarcação com o clone MIB-1 (não disponível no laboratório na altura de realização do estudo) poderia ser importante.

O *p-value* calculado para o índice proliferativo de para cada grau de anaplasia e variantes de grau I (meningotelial, fibroblástico, transição) foi inferior a 0,05, e como tal conclui-se que pelo menos um dos graus de anaplasia tem o índice proliferativo diferente dos restantes, no entanto, apenas foi possível distinguir os meningiomas atípicos e anaplásicos dos fibroblásticos.

O índice proliferativo foi superior em indivíduos de sexo masculino, o que sugere que estes indivíduos têm uma maior predisposição para serem afetados com meningiomas mais proliferativos, e tal como descrito na bibliografia, mais agressivos (23,67). Este facto poderá ser explicado pelo facto de o crescimento destes tumores ser positivamente dependente da progesterona, embora seja necessário reiterar que a contribuição das hormonas sexuais no crescimento de meningiomas ainda não

está suficientemente estabelecida (14,27,34). Comparando ainda os resultados obtidos, com os da bibliografia, é possível admitir que tenha sido obtida uma sub-marcação do Ki-67, devido à utilização do ac MM1 em vez do habitual MBI-1, dado que os resultados do índice proliferativo noutros estudos foram superiores em cerca de 50% (68).

5.3. Densidade Celular

A contagem de células, ou densidade celular, é um método que quantifica a celularidade dos meningiomas. Trata-se de um parâmetro que parece ser adequado para quantificar o grau de anaplasia dos meningiomas uma vez que, é independente da subjetividade do avaliador.

Alguns autores defendem que a contagem dos núcleos possa não ser um bom método para o diagnóstico histológico, pois para tal também deve ser tida em conta a arquitetura da própria célula, o que explica algum ceticismo em relação a este método (78). De forma a contornar este problema, e atendendo a que num corte histológico pode haver alongamento iatrogénico dos elementos tumorais e mascarar o verdadeiro valor da densidade celular, foi calculado o valor médio do tamanho nuclear que se situou dentro do esperado, $15,4\mu\text{m}^2$.

Foi observado um aumento da densidade celular nos meningiomas anaplásicos (grau III), e, ao inverso, uma marcada diminuição na variante meningotelial dos de grau I em relação aos demais. Estes dados reforçam o conhecimento prévio de que os meningiomas com maior grau de anaplasia são os mais celulares (71).

O *p-value* calculado para a densidade celular de para cada grau de anaplasia e variantes de grau I (meningotelial, fibroblástico, transição) foi inferior a 0,05, o que demonstra que pelo menos um dos graus de anaplasia tem uma densidade celular diferente da dos outros graus. Concluiu-se que apenas foi possível distinguir estatisticamente: os meningiomas anaplásicos dos meningoteliais e os meningiomas de transição e os meningiomas atípicos dos meningoteliais. De modo contrário ao

Índice proliferativo, não foi possível encontrar diferenças estatísticas significativas da densidade celular entre os indivíduos do sexo masculino e feminino. Estes resultados sugerem que o número de células existentes em cada caso tumoral é independente do sexo do paciente, mas não é independente do grau de anaplasia.

5.4. Curvas ROC

O índice proliferativo varia significativamente entre os diferentes laboratórios, sendo difícil sugerir pontes de corte confiáveis (18). No entanto, e tendo em conta esta limitação, tentou-se identificar os valores de corte para as duas variáveis quantitativas estudadas de acordo com o protocolo imunohistoquímico do LN do HSM (CHLN), através da análise das curvas ROC.

O ponto de corte obtido para o índice proliferativo foi de 1,63%. No entanto, é de referir que estes resultados demonstraram ter uma sub-marcação em relação a outros estudos com acs semelhantes, cujo ponto de corte obtido foi de 3,19% (76).

O ponto de corte obtido através da análise da curva ROC foi de 14,2 células/100 μm^2 para a densidade celular. Em casos de diagnóstico difícil de meningiomas atípicos, quando as figuras de mitoses são difíceis de encontrar e não existem outros critérios histológicos suficientes para sustentar o diagnóstico, este valor pode ser de grande importância na classificação do grau de anaplasia dos meningiomas, uma vez que se trata do valor a partir do qual o meningioma se poderá tornar mais agressivo. Ele poderá, inclusive, assumir uma importância reforçada como parâmetro preditivo da evolução do tumor, isto é, de um possível comportamento biológico pós-operatório maligno, nomeadamente compreensão da ocorrência de recidivas de certos meningiomas benignos.

Baseado nestas observações, e devido ao baixo índice proliferativo encontrados, os meningiomas fibroblásticos terão, previsivelmente, uma menor tendência de recorrência, ao contrário dos meningoteliais, os quais, dados ao seu maior índice proliferativo necessitarão de maior vigilância no pós-operatório.

Foram encontradas diferenças significativas na expressão das variáveis quantitativas entre os subtipos de meningiomas de grau I e a expressão de Ki-67. Os meningiomas meningoteliais tiveram uma expressão de Ki-67 superior aos restantes subtipos. Esta observação deve-se às células aracnoides comuns, responsáveis pelas diferenças entre os vários subtipos de meningiomas serem semelhantes às células tumorais dos meningiomas meningoteliais.

5.5. Limitações do estudo e perspectivas futuras

A utilização do método de imunohistoquímica para determinar o índice proliferativo não é um dos critérios de anaplasia dos meningiomas definidos pela OMS devido à sua variabilidade qualitativa dependente dos diferentes protocolos utilizados nos diferentes laboratórios de neuropatologia, e, também, pela não existência de pontos de corte para cada grau de anaplasia. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo podem não ser reproduzíveis noutros laboratórios. No entanto, o mesmo não passa por ser o objetivo principal do estudo, ao contrário do cálculo da densidade celular, uma vez este ser independente do protocolo de imunohistoquímica utilizado.

Uma outra limitação, já mencionada anteriormente foi a utilização do ac MM1 em detrimento do ac MIB-1, que é o mais utilizado e estudos semelhantes, o que limita as comparações.

A adição do estudo citogenético dos diferentes graus de anaplasia dos meningiomas poderia ter sido um dado adicional importante para melhor correlacionar os resultados obtidos, fundamentalmente com a contagem celular. Infelizmente, não é um exame rotineiro para o diagnóstico deste tipo de tumores.

Não é possível descartar completamente a existência de outros tipos celulares, por exemplo, células inflamatórias mononucleares, nas amostras de tecido tumoral envolvidas no estudo, com conseqüente “contaminação” da densidade celular. No

entanto, o método de análise e a quantificação dos resultados foi igual para todas as amostras, minimizando, deste modo, o possível erro.

5.6. Considerações finais

Este foi um estudo inédito pela extensão da amostra e metodologia utilizada e, cujos resultados podem trazer um contributo importante para a resolução do tema que nos propusemos tratar. Pensamos que o estudo deve ser continuado e reproduzido noutros laboratórios, e que os resultados agora obtidos implementados no estudo neuropatológico dos meningiomas.

Na realidade, a automatização da quantificação do índice proliferativo juntamente com o cálculo da densidade celular, com recurso a *softwares* estatísticos, garante a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados da contagem. Torna-se, assim, numa alternativa ou um complemento válido e imprescindível para a avaliação do potencial proliferativo dos meningiomas pós-cirurgia, com o objetivo de melhorar a previsão do comportamento biológico dos meningiomas.

6. Conclusão

Com os recentes progressos no campo patológico, na direção de uma abordagem mais quantitativa e específica torna-se imperativo que os critérios de diagnóstico se tornem mais claros e objetivos de forma a diminuir o tempo e o erro de diagnóstico, melhorando a previsão da evolução do tumor

Neste estudo quantificou-se a densidade celular em 250 meningiomas de diferentes graus de anaplasia e variantes mais frequentes de grau I, sendo a média das densidades celulares (células/100 μm^2) 14,8 \pm 3,68 para os meningiomas anaplásicos, 13,5 \pm 2,80 para os atípicos, 13,1 \pm 3,10 para os fibroblásticos, 11,5 \pm 2,93 para os meningoteliais e 12,6 \pm 4,27 para os de transição.

Outro dos objetivos principais deste estudo foi quantificar o índice proliferativo em diferentes graus de meningiomas e nas variantes mais frequentes de grau I, sendo a média do índice proliferativo (%) 3,85 \pm 4,97 para os meningiomas anaplásicos, 2,70 \pm 2,60 para os atípicos, 1,04 \pm 2,04 para os fibroblásticos, 2,23 \pm 3,04 para os meningoteliais e 2,01 \pm 2,15 para os de transição.

Estabeleceu-se uma relação entre os indicadores quantitativos e o grau de anaplasia, pois no geral, tecidos mais anaplásicos obtiveram maior densidade celular e maior índice proliferativo. O estudo do índice proliferativo através da imunomarcação com o ac Ki-67 (clone MM1) confirmou que este é um bom quantificador para determinação de anaplasia. Contudo, também veio confirmar a sua variabilidade, a técnica foi aplicada em simultâneo em todos os tecidos para minimizar a variabilidade intra técnica e apenas ser evidente a variabilidade dos casos. A densidade celular demonstrou-se útil na caracterização dos meningiomas mais agressivos, pelo que esta variável poderá ser um bom indicador para futuros estudos.

Foram identificados pontos de corte para os indicadores quantitativos, através de uma análise preliminar das curvas ROC, de forma a poderem ser utilizados na previsão do comportamento biológico pós-operatório dos meningiomas. Os resultados demonstraram que os pontos de corte obtidos foram de 1,63% para o índice de Ki-67 e de 14,2células/100 μm^2 para a densidade celular. Estes resultados

assumem grande importância, em casos em que morfológicamente o tumor se inclua numa variante de grau I, mas que o índice proliferativo seja superior a 1,63% ou a densidade celular superior a 14,2 células/100 μm^2 , o que poderá revelar uma possível malignização do tumor. Por outro lado, estes pontos de corte serão úteis na análise dos meningiomas, principalmente em casos de dúvida entre um diagnóstico anaplásico e atípico.

Também foi analisado a relação entre os indicadores quantitativos e as variáveis clínicas. Contudo não foi conseguida obter qualquer relação entre o diagnóstico histológico e a idade do doente. Por outro lado, foi obtido apenas uma correlação entre o sexo e o índice proliferativo, que apesar de não ser importante para o diagnóstico do tumor, poderá ser útil na sua evolução, no sentido em que para um determinado valor de índice proliferativo poderá sugerir uma malignização em indivíduos do sexo masculino, mas não em indivíduos do sexo feminino.

Com o aumento e a melhoria das técnicas de imunohistoquímica, há a necessidade de padronização dos ensaios através de programas computacionais que ajudem a eliminar a variabilidade baseada na observação do patologista e a sensibilidade dos testes quantitativos.

A aquisição automática das imagens marcadas com o anticópsio Ki-67 obteve resultados de quantificação celular reproduzíveis. No entanto, a implementação de um procedimento interlaboratorial necessitará de estudos adicionais para a validação do método e dos pontos de corte.

7. Anexos

Lista de Reagentes

- DAB+ chromogen(x50) Dako Real™, Lote 00092783, ref K5007 (2015-03)
- Substrate Buffer, Dako Real™, Lote: 00092783, ref K5007 (2015-05)
- Hydrogen peroxide 30%, 250 mL; K45302610 416
- Hematoxilina Mayer's hemalum solution, 500mL, Merck KGaA, Hx 242489; CI 75290; 4,45g/L
- NCL-L-Ki-67-MM1; 1mL, Lote: 6007529, proteína total: 3.3g/L; NovoCastra™; (2013-11)
- Eosina – Eosin gelblich, 25 g Merck, 6357863, CI 45380
- Laminas Normax – Dimensão: 24X60 mm; Espessura: 0130.17 mm

8. Bibliografia

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2006 May 10;24(14):2137–50.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014: *Cancer Statistics, 2014*. *CA Cancer J Clin*. 2014 Jan;64(1):9–29.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374–403.
4. Siegel A, Sapru HN. *Essential neuroscience*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
5. Sadler TW. Embryology of neural tube development. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2005 May 15;135C(1):2–8.
6. Almeida LB de. *Introdução à neurociência: arquitetura, função, interações e doença do sistema nervoso*. Lisboa: Climepsi Editores; 2010.
7. Mahendru G. Meninges in cancer imaging. *Cancer Imaging*. 2009;9(Special Issue A):S14–21.
8. Decimo I, Fumagalli G, Berton V, Krampera M, Bifari F. Meninges: from protective membrane to stem cell niche. *Am J Stem Cells*. 2012;1(2):92–105.
9. Netter FH. *Atlas of human anatomy*. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2006. 548 p.
10. Weber EC, Vilensky JA, Carmichael SW. *Netter anatomia em imagens essencial* [Internet]. 2009 [cited 2014 Nov 18]. Available from: <http://alltitles.ebrary.com/Doc?id=10894970>
11. Kida S, Yamashima T, Kubota T, Ito H, Yamamoto S. A light and electron microscopic and immunohistochemical study of human arachnoid villi. *J Neurosurg*. 1988 Sep;69(3):429–35.
12. Lee JH. Meningiomas: Diagnosis, Treatment, and Outcome. *Am J Neuroradiol*. 2009 Nov 1;30(10):E157–E157.
13. Marta GN, Correa SFM, Teixeira MJ. Meningioma: review of the literature with emphasis on the approach to radiotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011 Nov;11(11):1749–58.
14. Marosi C, Hassler M, Roessler K, Reni M, Sant M, Mazza E, et al. Meningioma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 Aug;67(2):153–71.

15. Whittle IR, Smith C, Navoo P, Collie D. Meningiomas. *The Lancet*. 2004 May;363(9420):1535–43.
16. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol*. 2006 Dec;5(12):1045–54.
17. Commins DL, Atkinson RD, Burnett ME. Review of meningioma histopathology. *Neurosurg Focus*. 2007;23(4):E3.
18. Słodkowska J, Markiewicz T, Grala B, Kozłowski W, Papierz W, Pleskacz K, et al. Accuracy of a remote quantitative image analysis in the whole slide images. *Diagn Pathol*. 2011;6(Suppl 1):S20.
19. Backer-Grøndahl T, Moen BH, Torp SH. The histopathological spectrum of human meningiomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(3):231–42.
20. Jo K, Park H-J, Nam D-H, Lee J-I, Kong D-S, Park K, et al. Treatment of atypical meningioma. *J Clin Neurosci*. 2010 Nov;17(11):1362–6.
21. Moradi A, Semnani V, Djam H, Tajodini A, Zali AR, Ghaemi K, et al. Pathodiagnostic parameters for meningioma grading. *J Clin Neurosci*. 2008 Dec;15(12):1370–5.
22. Schneider B, Pülhorn H, Röhrig B, Rainov NG. Predisposing conditions and risk factors for development of symptomatic meningioma in adults. *Cancer Detect Prev*. 2005;29(5):440–7.
23. Kasuya H, Kubo O, Tanaka M, Amano K, Kato K, Hori T. Clinical and radiological features related to the growth potential of meningioma. *Neurosurg Rev*. 2006 Oct;29(4):293–7.
24. Phillips LE, Koepsell TD, van Belle G, Kukull WA, Gehrels J-A, Longstreth WT Jr. History of head trauma and risk of intracranial meningioma: population-based case-control study. *Neurology*. 2002 Jun 25;58(12):1849–52.
25. Annegers JF, Laws ER Jr, Kurland LT, Grabow JD. Head trauma and subsequent brain tumors. *Neurosurgery*. 1979 Mar;4(3):203–6.
26. Eskandary H, Sabba M, Khajepour F, Eskandari M. Incidental findings in brain computed tomography scans of 3000 head trauma patients. *Surg Neurol*. 2005 Jun;63(6):550–3; discussion 553.
27. Wiemels J, Wrensch M, Claus EB. Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol*. 2010 Sep;99(3):307–14.

28. Preston DL, Ron E, Yonehara S, Kobuke T, Fujii H, Kishikawa M, et al. Tumors of the nervous system and pituitary gland associated with atomic bomb radiation exposure. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Oct 16;94(20):1555–63.
29. Rodvall Y, Ahlbom A, Pershagen G, Nylander M, Spännare B. Dental radiography after age 25 years, amalgam fillings and tumours of the central nervous system. *Oral Oncol.* 1998 Jul;34(4):265–9.
30. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 1989 Nov 3;246(4930):629–34.
31. Schüz J, Böhler E, Berg G, Schlehofer B, Hettinger I, Schlaefer K, et al. Cellular phones, cordless phones, and the risks of glioma and meningioma (Interphone Study Group, Germany). *Am J Epidemiol.* 2006 Mar 15;163(6):512–20.
32. Lönn S, Ahlbom A, Hall P, Feychting M, Swedish Interphone Study Group. Long-term mobile phone use and brain tumor risk. *Am J Epidemiol.* 2005 Mar 15;161(6):526–35.
33. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, et al. Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol.* 1995 Apr;146(4):827–32.
34. Korhonen K, Salminen T, Raitanen J, Auvinen A, Isola J, Haapasalo H. Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen receptor expression. *J Neurooncol.* 2006 May 13;80(1):1–7.
35. Brenner AV, Linet MS, Fine HA, Shapiro WR, Selker RG, Black PM, et al. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2002 May 10;99(2):252–9.
36. Schoemaker M, Swerdlow A, Hepworth S, van Tongeren M, Muir K, McKinney P. History of Allergic Disease and Risk of Meningioma. *Am J Epidemiol.* 2006 Dec 5;165(5):477–85.
37. Alexiou GA, Gogou P, Markoula S, Kyritsis AP. Management of meningiomas. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010 Apr;112(3):177–82.
38. Newton HB. Hydroxyurea chemotherapy in the treatment of meningiomas. *Neurosurg Focus.* 2007;23(4):E11.
39. Rosenthal MA, Ashley DL, Cher L. Treatment of high risk or recurrent meningiomas with hydroxyurea. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas.* 2002 Mar;9(2):156–8.
40. Weston G, Martin A, Mufti G, Strong A, Gleeson M. Hydroxyurea Treatment of Meningiomas: A Pilot Study. *Skull Base.* 2006 May;16(3):157–60.

41. Newton HB, Scott SR, Volpi C. Hydroxyurea chemotherapy for meningiomas: enlarged cohort with extended follow-up. *Br J Neurosurg.* 2004 Oct;18(5):495–9.
42. Pollock BE, Stafford SL, Utter A, Giannini C, Schreiner SA. Stereotactic radiosurgery provides equivalent tumor control to Simpson Grade 1 resection for patients with small- to medium-size meningiomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Mar 15;55(4):1000–5.
43. Preusser M, Berghoff AS, Hottinger AF. High-grade meningiomas: new avenues for drug treatment? *Curr Opin Neurol.* 2013 Dec;26(6):708–15.
44. Lee SH, Lee YS, Hong YG, Kang CS. Significance of COX-2 and VEGF expression in histopathologic grading and invasiveness of meningiomas. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2014 Jan;122(1):16–24.
45. Takeuchi H, Kubota T, Kabuto M, Kitai R, Nozaki J, Yamashita J. Prediction of recurrence in histologically benign meningiomas: proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemical study. *Surg Neurol.* 1997 Nov;48(5):501–6.
46. Jones TC, Hunt RD, King NW, Nascimento FG do N. *Patologia veterinária.* São Paulo: Editora Manole; 2000.
47. Schafer KA. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol.* 1998 Nov 1;35(6):461–78.
48. Hung DT, Jamison TF, Schreiber SL. Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chem Biol.* 1996 Aug;3(8):623–39.
49. Lodish HF, editor. *Molecular cell biology.* 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2000. 1084 p.
50. Goodman SR, editor. *Medical cell biology.* 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Inc., Academic Press; 2008. 320 p.
51. Maller J I, Gautier J, Langan TA, Lohka MJ, Shenoy S, Shalloway D, et al. Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *J Cell Sci Suppl.* 1989;12:53–63.
52. Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol.* 1990 Mar;43(3):184–92.
53. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131–49.
54. Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer.* 1994 Mar;69(3):409–16.

55. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*. 1990 Dec;17(6):489–503.
56. 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 J Int Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13–20.
57. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1984 Oct;133(4):1710–5.
58. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*. 2002 Jan;40(1):2–11.
59. Kill IR. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*. 1996 Jun;109 (Pt 6):1253–63.
60. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311–22.
61. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993 Nov;123(3):513–22.
62. Nakasu S, Li DH, Okabe H, Nakajima M, Matsuda M. Significance of MIB-1 staining indices in meningiomas: comparison of two counting methods. *Am J Surg Pathol*. 2001 Apr;25(4):472–8.
63. Baisch H, Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet*. 1987 Jul;20(4):387–91.
64. Shepherd NA, Richman PI, England J. Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol*. 1988 Jul;155(3):213–9.
65. Roser F, Samii M, Ostertag H, Bellinzona M. The Ki-67 proliferation antigen in meningiomas. Experience in 600 cases. *Acta Neurochir (Wien)*. 2004 Jan 1;146(1):37–44.
66. Grala B, Markiewicz T, Kozłowski W, Osowski S, Słodkowska J, Papierz W. New automated image analysis method for the assessment of Ki-67 labeling index in meningiomas. *Folia Histochem Cytobiol [Internet]*. 2010 May 1 [cited 2013 Nov 12];47(4). Available from: <http://czasopisma.viamedica.pl/fhc/article/view/4304>

67. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol*. 1997 Dec;21(12):1455–65.
68. Akyildiz EU, Oz B, Comunoglu N, Aki H. The relationship between histomorphological characteristics and Ki-67 proliferation index in meningiomas. *Bratisl Lekárske Listy*. 2010;111(9):505–9.
69. Kolles H, Niedermayer I, Schmitt C, Henn W, Feld R, Steudel WI, et al. Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. *Acta Neurochir (Wien)*. 1995;137(3-4):174–81.
70. Kononen J, Bubendorf L, Kallionimeni A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844–7.
71. Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005 Jul 1;42(4):405–26.
72. Taylor CR, Rudbeck, Lars. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide*. 6th ed. 2013. 3-218 p.
73. Kampf C, Olsson I, Ryberg U, Sjöstedt E, Pontén F. Production of Tissue Microarrays, Immunohistochemistry Staining and Digitalization Within the Human Protein Atlas. *J Vis Exp [Internet]*. 2012 May 31 [cited 2014 Jan 4];(63). Available from: <http://www.jove.com/video/3620/>
74. Bruna J, Brell M, Ferrer I, Gimenez-Bonafe P, Tortosa A. Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol*. 2007 Apr;27(2):114–20.
75. Terzi A, Saglam EA, Barak A, Soylemezoglu F. The significance of immunohistochemical expression of Ki-67, p53, p21, and p16 in meningiomas tissue arrays. *Pathol - Res Pract*. 2008 May;204(5):305–14.
76. Willis J, Smith C, Ironside JW, Erridge S, Whittle IR, Everington D. The accuracy of meningioma grading: a 10-year retrospective audit. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2005 Apr;31(2):141–9.
77. Pavelin S, Becic K, Forempoher G, Mrklic I, Pogorelic Z, Titlic M, et al. Expression of ki-67 and p53 in meningiomas. *Neoplasma*. 2013;60(05):480–5.
78. Khoo VS, Pollack A, Cowen D, Joon DL, Patel N, Terry NH, et al. Relationship of Ki-67 labeling index to DNA-ploidy, S-phase fraction, and outcome in prostate cancer treated with radiotherapy. *The Prostate*. 1999 Nov 1;41(3):166–72.

79. Ahlgren G, Pedersen K, Lundberg S, Aus G, Hugosson J, Abrahamsson PA. Tumor cell proliferation in prostate cancer after 3 months of neoadjuvant LHRH analogue treatment is a prognostic marker of recurrence after radical prostatectomy. *Urology*. 1999 Aug;54(2):329–34.