

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

Geraldine Trott

**Avaliação da Expressão Imuno-
histoquímica do Receptor de
Dopamina D₂ e da Proteína p53 em
Meningiomas**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2014**

Geraldine Trott

Avaliação da Expressão Imuno- histoquímica do Receptor de Dopamina D₂ e da Proteína p53 em Meningiomas

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

Orientador: Prof^a Dr^a Julia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Miriam da Costa Oliveira
Prof^a Dr^a Lúgia Maria Barbosa-Coutinho

**Porto Alegre
2014**

“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem: “Porquê? Eu
sonho com as coisas que nunca foram e digo: “Por que não?”

(George Bernard Shaw)”

Agradecimentos

Aos meus pais, Carlos e Lisiane, que sempre me incentivaram a estudar, a ir atrás dos meus sonhos e que muitas vezes abdicaram dos seus próprios em favor dos meus.

Ao meu marido, Fernando, pelo apoio em todos os momentos que precisei, companheirismo e compreensão, além sempre me incentivar a ir atrás dos meus objetivos.

À minha orientadora, Julia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima, pela orientação, apoio, paciência, incentivo e principalmente pela confiança deposita em mim para a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dra Lígia Maria Barbosa-Coutinho, pelos ensinamentos e suporte na análise das lâminas e revisão anátomo-patológica.

À minha co-orientadora, Dra Miriam da Costa Oliveira, pelo apoio e pela confiança deposita em mim.

À Rosalva, Keli e Teresinha, pela excelente competência técnica, solução de questões e também pela amizade construída desde que iniciei no laboratório de pesquisa em Patologia.

As secretárias Luciani Spencer e Maristela Pasin, pela grande competência profissional e pelo carinho e atenção com os alunos da instituição.

Às colegas e amigas Camila, Bárbara, Luiza, Lisiane e Marícia e todas as outras “princesas da patologia”, pelo companheirismo ao longo desta jornada e também por deixarem o laboratório mais alegre.

Às minhas queridas vó Joecy e madrinha Esther, por me ensinarem a sempre ter fé e estarem sempre torcendo por mim.

À minha tia Eliane, pelo apoio e presença constante na minha vida.

Aos meus cunhados, André e Alexandra e aos meus sogros, Régis e Silvana, meu muito obrigado pelo constante apoio e amizade.

Às minhas grandes amigas e confidentes Deisy e Marília, pelo incentivo e companheirismo em todas as etapas da minha vida.

A minha querida prima e amiga, Patrícia, que apesar da distância, está sempre presente.

À todos os profissionais da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), pela alta qualidade do ensino e conhecimento passados a mim desde a graduação.

A todo o Centro de Neuroendocrinologia UFCSPA/Santa Casa, por todo o conhecimento proporcionado durante reuniões, disciplinas, eventos e conversas.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	VII
Lista de figuras.....	VIII
Lista de tabelas.....	IX
Resumo da dissertação.....	X
 1. Introdução.....	 1
1.1. Meningiomas	2
1.1.1. Epidemiologia.....	2
1.1.2. Etiologia e patogênese.....	2
1.1.3. Localização.....	3
1.1.4. Aspectos morfológicos, microscópicos e classificação..	4
1.1.5. Tratamento e prognóstico.....	5
1.1.6. Influência hormonal nos meningiomas.....	6
1.2. A Dopamina e seus receptores.....	7
1.2.1. Receptores de dopamina em meningiomas.....	10
1.3. Proteína p53.....	11
1.3.1. Proteína p53 em meningiomas.....	13
1.4. Referências bibliográficas.....	15
 2. Objetivos.....	 19
3. Artigo científico redigido em inglês.....	20
4. Considerações finais.....	36
5. Anexos.....	37

Lista de abreviaturas

AMPC: adenosina 3',5' - monofosfato cíclico

D₁-D₅: receptores dopaminérgicos 1 a 5

D_{1-like}: família de receptores D₁ e D₅

D_{2-like}: família de receptores D₂, D₃ e D₄

D_{2L}: isoforma longa do receptor D₂

D_{2S}: isoforma curta do receptor D₂

DNA: ácido desoxirribonucleico

ERK: proteína quinase regulada por sinal extracelular

GH: hormônio do crescimento

IH: imuno-histoquímica

kDa: kilodalton

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

NF2: neurofibromatose tipo 2

OMS: organização mundial de saúde

p53: proteína p53

PCR: reação em cadeia da polimerase

RA: receptores de andrógenos

RE: receptores de estrógeno

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

RP: receptores de progesterona

SKF-38393: agonista dopaminérgico específico do D₁

SNC: sistema nervoso central

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismos de transdução de sinal associados com a ativação dos receptores dopaminérgicos.....	7
Figura 2. Esquema das duas isoformas do receptor D ₂	8

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Descrição dos subtipos histológicos dos meningiomas de acordo com sua classificação e percentagem de ocorrência.....	4
---	---

Resumo da Dissertação

Introdução: Os meningiomas são tumores frequentes, em geral benignos, mas com alta taxa de recorrência pós-cirúrgica. Controvérsias em relação à gênese e desenvolvimento desses tumores justificam o estudo atual.

Objetivos: Investigar a presença e implicações da proteína mutada p53 (p53) e do receptor dopaminérgico D₂ (DR-D₂) em uma série representativa de meningiomas.

Material e Métodos: Amostras de 157 meningiomas (37 homens e 120 mulheres) foram avaliadas pelo método imuno-histoquímico para presença de p53 e DR-D₂. Os tumores foram classificados como grau I (141, 89,8%); grau II (13, 8,3%) e III (3, 1,9%).

Resultados: Expressão da p53 foi detectada em 49,7% dos casos, reforçando o papel da p53 no processo de desenvolvimento tumoral. Quanto ao DR-D₂, o mesmo foi positivo em 93,6% dos casos.

Conclusões: Ambos marcadores apresentaram expressão sem diferenças significativas entre os graus tumorais. A alta imunorreatividade do DR-D₂ estimula a investigação do potencial terapêutico dos agonistas dopaminérgicos na evolução dos meningiomas.

1. Introdução

Os meningiomas constituem aproximadamente 1/3 dos tumores intracranianos, com pico de incidência entre sexta e sétima décadas de vida, sendo mais frequentes em mulheres, na proporção de 2:1 (Dolecek e cols., 2012). A maioria possui comportamento biológico benigno (Santana Jr e cols, 2006), mas a taxa de recorrência é elevada (Wahab e Al-Azzawi, 2003).

Vários fatores hormonais têm sido citados como predisponentes ao crescimento dos meningiomas. Os meningiomas expressam receptores de andrógenos (Carroll e cols., 1995), receptores de estrógeno e progesterona (Leaes e cols., 2010) e receptores de hormônios não esteroides, incluindo receptores de hormônio do crescimento (Friend e cols., 1999), somatotastina (Reubi e cols., 1986) e dopamina (Schrell e cols., 1990; Carroll e cols., 1996).

Mutação do gene da proteína p53, proteína relacionada à supressão tumoral, está presente em tumores de diferentes tecidos do organismo (Hollstein e cols., 1991). Na gênese dos meningiomas sua presença é controversa, havendo citação de alto percentual de expressão imuno-histoquímica (IH) da proteína mutada nos meningiomas atípicos e malignos e baixo percentual nos benignos (Cho e cols., 1999).

As elevadas taxas de recorrência desses tumores, levam a estudos nos quais se busquem não só alvos de terapias, mas também marcadores tumorais relevantes para seu acompanhamento, uma vez que ainda permanecem controvérsias em relação à gênese e desenvolvimento dos meningiomas.

1.1. Meningiomas

1.1.1. Epidemiologia

Os meningiomas são tumores predominantemente benignos, de crescimento lento e que constituem aproximadamente 35% de todos os tumores intracranianos. A incidência anual aproximada é de 7,22/100.000 habitantes, aumentando principalmente após os 65 anos. A prevalência é de 50,4/100.000 habitantes (Dolecek e cols., 2012). Essas neoplasias são muito raras em crianças. Na população negra, a incidência dos meningiomas é significativamente mais alta que nos brancos (Dolecek e cols., 2012). Em relação ao gênero, esses tumores são mais de duas vezes mais comuns no sexo feminino em comparação ao masculino (Dolecek e cols., 2012). As taxas de sobrevida em 5 anos são em média de 75 a 87% e em 10 anos de 58% (Davis e cols., 2001; Wahab e Al-Azzawi, 2003).

1.1.2. Etiologia e patogênese

A etiologia dos meningiomas ainda é desconhecida. Vários fatores endógenos e exógenos predis põem ao seu surgimento. Juntamente com o aumento de idade, um fator associado a essas neoplasias é a exposição à radiação ionizante. É clássico o estudo no qual crianças tratadas com radiação ionizante para *tinea capitis* desenvolveram meningiomas na vida adulta (Rone cols., 1988). Pacientes portadores de neurofibromatose tipo 2 (NF2) desenvolvem meningiomas, sendo descritas mutações no gene supressor de tumor NF2, localizado no braço longo do cromossomo 22 (22q) (Collins e cols., 1990; Lamszus e cols., 2004). Também

há famílias com maior susceptibilidade aos meningiomas que não apresentam NF2 (Lamszus e cols., 2004). Todavia, a exposição a altas doses de radiação ionizante e a coexistência com certas condições genéticas raras explicam somente uma pequena fração da incidência da doença. A evidência de que hormônios gênero específicos implicam na patogênese dos meningiomas provém de dados mostrando aumento da incidência dessas neoplasias em mulheres e também com sua associação positiva com carcinoma de mama e crescimento aumentado durante gestação e menstruação (Wahab e Al-Azzawi, 2003; Lamszus e cols., 2004).

1.1.3. Localização

Os meningiomas são tumores mesodérmicos, de origem no mesotélio ou exotélio aracnoidal. São mais frequentemente encontrados nos pontos em que a aracnóide se projeta para o interior da dura-máter, formando os corpúsculos de Pacchioni ou acompanhando a saída dos grandes seios venosos. Aproximadamente 90% dos meningiomas estão localizados na região supratentorial e cerca de dois terços na região anterior do crânio. Um percentual pequeno pode ser encontrado na região infratentorial e localizações menos frequentes incluem tumores intra-orbitários, intraventriculares, intra-ósseos, extracranianos e da raque (Barbosa-Coutinho e Hilbig, 2006).

1.1.4. Aspectos morfológicos, microscópicos e classificação

Macroscopicamente, os meningiomas apresentam-se como massas nodulares de consistência variável, com superfície externa lisa ou nodular, aderidas à face interna da dura-máter e projetando-se na caixa craniana ou no canal vertebral. O tamanho dos nódulos pode variar desde alguns milímetros até vários centímetros de diâmetro (Barbosa e Hilbig, 2006). A superfície de corte do tumor pode ser branco-acinzentada, firme, com estrutura espiralada; outras vezes, é homogênea e de consistência mole. Com frequência apresentam focos de calcificação. Certos meningiomas são intensamente vascularizados e, por esta razão, avermelhados. Microscopicamente apresentam aspectos variados e podem mimetizar outros tipos tumorais, dos quais a diferenciação só é possível através de técnicas especiais (Pitella e cols., 2011).

Segundo a OMS, de acordo com suas características histológicas e probabilidade de recorrência, os meningiomas são classificados em três graus (I, II e III). Os meningiomas de grau I (80-90%) geralmente apresentam características benignas e bom prognóstico, embora possam apresentar recorrência. Já os meningiomas de grau II (5-15%) mostram alguns aspectos de malignidade histológica, como a presença de quatro ou mais mitoses por 10 campos de grande aumento, ou o encontro de três dos seguintes aspectos histológicos: alta celularidade, aumento da relação núcleo/citoplasma, nucléolos proeminentes, arranjo arquitetural difuso e necrose. Meningiomas malignos, ou os de grau III (1-3%), são tumores que apresentam características histológicas de malignidade que são: presença de 20 ou mais mitoses por 10 campos de grande aumento e aspectos citológicos semelhantes aos sarcomas, carcinomas ou

melanomas (Kleihues e cols., 2000; Santana Jr e cols, 2006; Pitella e cols., 2011). A Tabela 1 mostra a distribuição dos subtipos histológicos dos meningiomas entre os graus.

Tabela 1: Descrição dos subtipos histológicos dos meningiomas de acordo com sua classificação e percentagem de ocorrência

Grau	Comportamento Histológico	Subtipos histológicos	% de ocorrência
I	benigno	meningotelial, fibroblástico, transicional, psamomatoso, angiomatoso, microcístico, secretor, linfoplasmocítico, metaplásico	80-90%
II	baixa malignidade	atípico, meningioma de células claras, cordóide	5-15%
III	maligno	rabdóide, papilar, anaplásico	1-3%

(Adaptado de Kleihues e cols., 2000; Louis e cols., 2007)

1.1.5. Tratamento e prognóstico

O tratamento de escolhados meningiomas sintomáticos é a ressecção cirúrgica. Contudo, a taxa de recorrência desses tumores é elevada e parece estar relacionada ao grau histológico do tumor ao tipo de ressecção cirúrgica, variando de 9 a 20% quando a ressecção for completa e de 18 a 50% nas incompletas (Wahab e Al-Azzawi, 2003). Para meningiomas recorrentes ou aqueles inoperáveis devido à sua localização, a radioterapia permanece como tratamento de escolha, uma vez que ainda não se encontrou quimioterapia ou terapia com base hormonal efetiva (Sanson e Cornu, 2000).

1.1.6. Influência hormonal nos meningiomas

Diante da predominância em mulheres, a dependência aos hormônios sexuais tem sido estudada nos meningiomas (Smith e cols., 1978; Roelvink e cols., 1987; Moss e cols., 2001; Custer e cols., 2006). Foram identificados receptores para andrógenos (RA), estrógeno (RE), e progesterona (RP) (Carroll e cols., 1993; Carroll e cols., 1995; Hilbig e Barbosa-Coutinho, 1998; Milenkovic e cols., 2004; Leaes e cols., 2010). Há descrição na literatura que aproximadamente 2/3 dos meningiomas expressam RA e RP, enquanto menos que 1/3 expressa RE (Sanson e Cornu, 2000).

O crescimento do meningiomas pode ser manipulado *in vitro* por progesterona e seus antagonistas (Olson e cols., 1986), assim como antagonistas de RA inibem o crescimento dos meningiomas *in vitro* (Adams e cols., 1990). Os efeitos variáveis do crescimento de células de meningiomas em cultura foram observados com estradiol, progesterona e tamoxifeno, enquanto a mifepristona inibiu o crescimento dessas células. A diferença de resposta dos meningiomas aos tratamentos hormonais pode ser devido à expressão de diferentes receptores de progesterona, cofatores esteroidais ou mutação do gene p53 (Wahab e Al-Azzawi, 2003).

A presença de receptores de hormônios não esteróides também foi descrita. Friend e colaboradores identificaram a presença de RNAm para o hormônio do crescimento (GH) e efeitos antiproliferativos de seus antagonistas em células de meningiomas em cultura (Friend e cols., 1999). Receptores para somatostatina também são expressos nos meningiomas (Reubi e cols., 1986), seu papel ainda é controverso, tendo sido relacionado tanto com efeitos antiproliferativos como

estimuladores da proliferação celular dos meningiomas *in vitro* (Kunert-Radek e cols., 1987; Koper e cols., 1992). Os receptores da dopamina também já foram relacionados à cinética celular dos meningiomas e serão detalhados a seguir.

1.2. A dopamina e seus receptores

A dopamina é o neurotransmissor da família das catecolaminas predominante no cérebro dos mamíferos, onde controla, através da ligação aos seus receptores, várias funções incluindo a atividade locomotora, cognição, emoções, ingestão de alimentos e regulação endócrina (Missale e cols., 1998).

A dopamina exerce suas funções através de cinco receptores nomeados D₁-D₅. Os receptores dopaminérgicos são membros da superfamília de receptores ligados à proteína G com domínio transmembrana e, à semelhança dos receptores de outros neurotransmissores, são polipetídeos de cadeia única, compostos de três unidades: o sítio de reconhecimento, o acoplador e o transdutor. Os sítios para dopamina não são sempre idênticos, sendo ligados a vários sistemas de amplificação e transdução (Pivonello e cols., 2007). Esses receptores estão organizados em dois grupos: o grupo D₁, representado pelos receptores D₁ e D₅ e o grupo D₂, pelos receptores D₂, D₃ e D₄ (Gingrich e Caron, 1993; Ben-Jonathan e Hnasko, 2001). A definição desses grupos está baseada na relação com os mecanismos de transdução; enquanto os do grupo D₁ estimulam a enzima adenilato ciclase e aumentam o nível intracelular de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), os do grupo D₂ inibem essa enzima e diminuem o AMPc intracelular (Figura 1). Os receptores D₁ e D₅ apresentam homologia do

domínio transmembrana de 80%, os receptores D₂ e D₃ de 75% e os receptores D₄ e D₂ de 53% (Missale e cols., 1998).

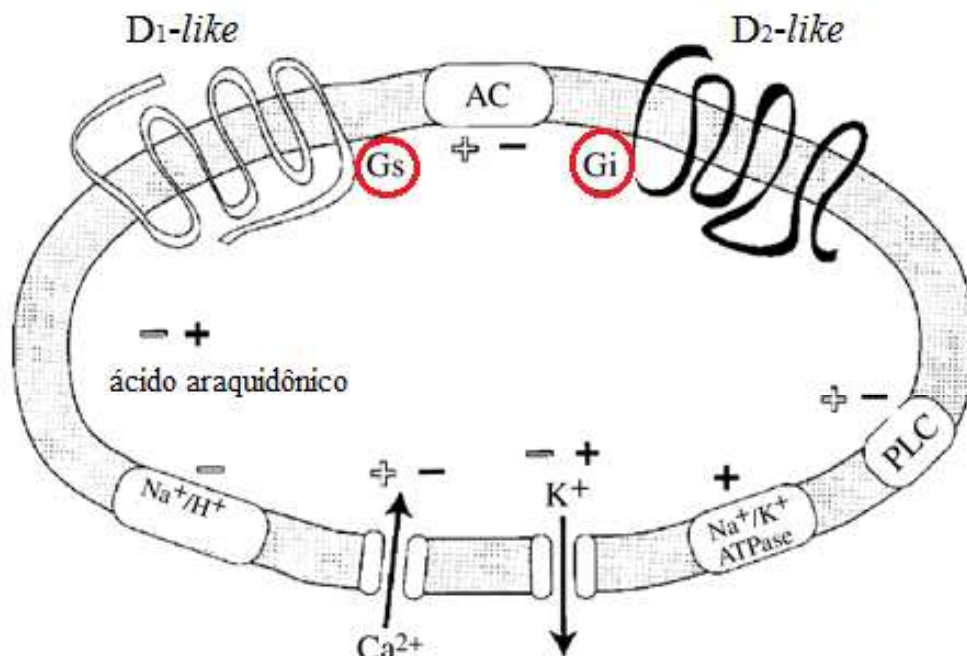


Figura 1. Esquema com os mais importantes mecanismos de transdução de sinal associados com a ativação dos receptores dopaminérgicos. (Imagem adaptada de Pivonello e cols., 2007)

O receptor D₂, foco principal deste estudo, apresenta duas variantes funcionais, com efeitos farmacológicos similares, mas diferentes características funcionais: a isoforma longa, denominada D_{2L} e a isoforma curta, denominada D_{2S}. Essas duas isoformas diferem pela presença ou ausência de uma área com 29 resíduos de aminoácidos na terceira alça citoplasmática da sua estrutura protéica (Senogles, 2000; Vallone e cols., 2000). A Figura 2 ilustra as duas isoformas do receptor D₂.

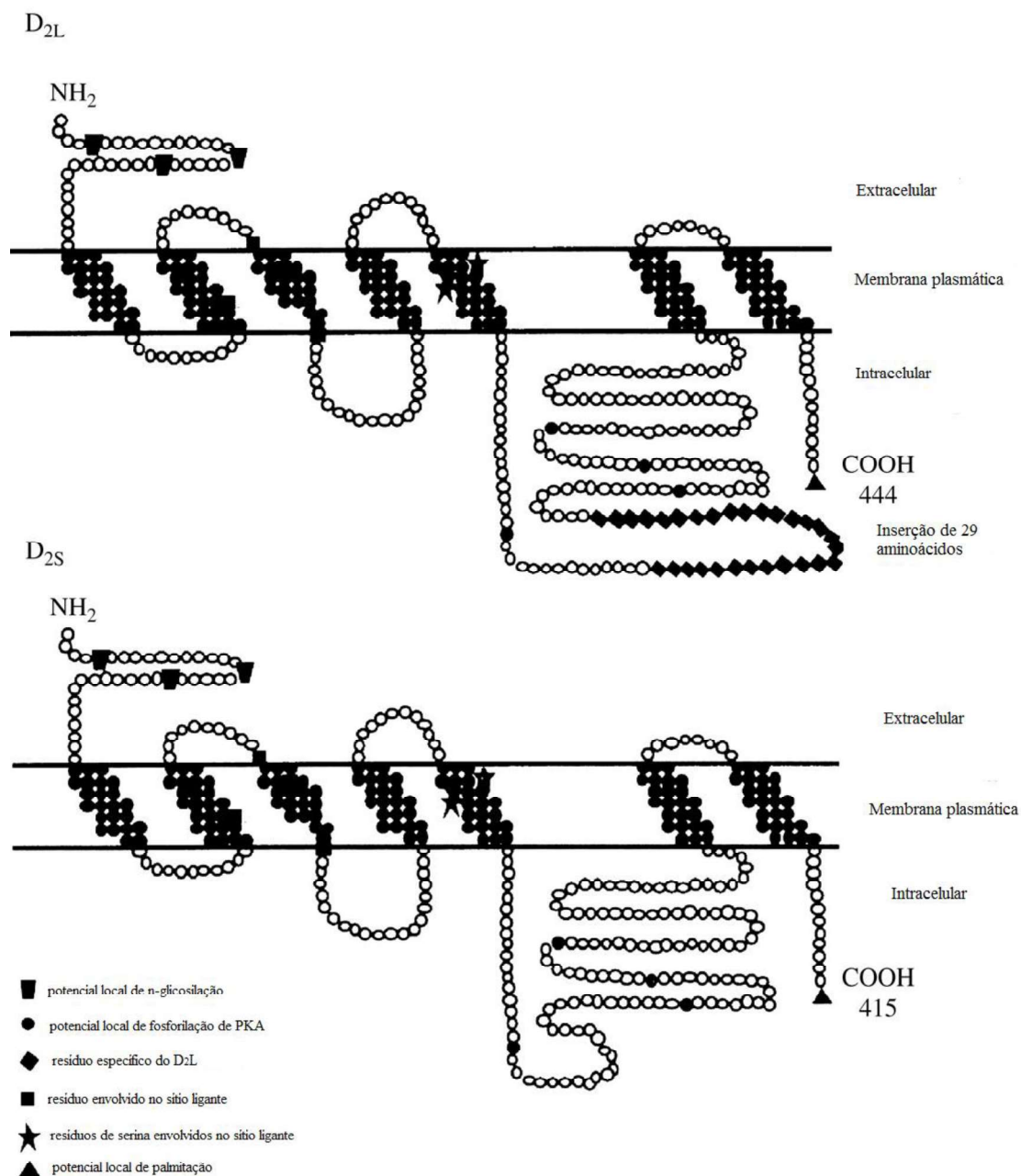


Figura 2. Esquema das duas isoformas do receptor D₂. Trecho específico de aminoácidos presente em D_{2L} e ausente em D_{2S} é indicado na terceira alça citoplasmática. (Imagem adaptada de Pivonello e cols., 2007).

Os receptores dopaminérgicos estão distribuídos no sistema nervoso central nos neurônios dopaminérgicos da substância nigra, área tegmental ventral e hipotálamo, estando localizados no corpo estriado, sistema límbico, córtex cerebral e infundíbulo. Sua presença também foi demonstrada na hipófise, no

sistema nervoso periférico, sistema cardiovascular, rins e glândulas suprarrenais (Missale e cols., 1998).

O desenvolvimento de anticorpos específicos para os receptores D₂ possibilitou o conhecimento da expressão e da distribuição tecidual desses receptores através da aplicação de técnica de imunohistoquímica (IH) (Levey e cols., 1993). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) também tem sido empregada na avaliação da expressão gênica dos receptores D₂ em diferentes amostras teciduais (Pivonello e cols., 2004).

1.2.1. Receptores de dopamina em meningiomas

Os receptores de dopamina estão relacionados à cinética celular dos meningiomas. Até o momento, não há descrição de dados relacionados à expressão IH dos receptores dopaminérgicos em meningiomas. A avaliação da presença do DR-D₂ em meningiomas é negativa pela análise de Scatchard (Schrell e cols., 1992; Carroll e cols., 1996), detectável em alguns casos por meio de *Northern blot* (Carroll e cols., 1996), e positiva em 100% dos casos com a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual as sequências encontradas do receptor D₂ mostraram-se idênticas às do *Genbank* (Carroll e cols., 1996). É importante ressaltar que enquanto a técnica de PCR detecta a expressão gênica, a IH detecta a expressão de proteínas no tecido (Cho e cols., 1999).

Schrell e cols. (1990), analisando o efeito dos agonistas dopaminérgicos na proliferação celular, descrevem que a dopamina e seus agonistas bromocriptina (ação predominantemente no receptor D₂), apomorfina (D₁ e D₂), SKF-38393

(específico do D₁), em concentrações micromolares, levam a uma diminuição significativa da proliferação celular de meningiomas em cultura (Schrell e cols., 1990). Em incubação de células de meningiomas com bromocriptina, foi demonstrada inibição significativa da proliferação celular, de 25 a 56%, inibição maior quanto maior a concentração de bromocriptina (Adams e cols., 1990). Mais recentemente, Castelo-Branco e cols. (2011), relataram o caso de paciente com meningioma recorrente que apresentou boa resposta à terapia com cabergolina (agonista dopaminérgico de ação predominante via DR-D₂) com ausência de sintomas compressivos ou aumento de massa nos 11 anos subsequentes ao tratamento, sugerindo que a proliferação celular dos meningiomas pode estar, em algum grau, sob controle dopaminérgico (Castelo-Branco e cols., 2011).

1.3. Proteína p53

O p53 é um gene de supressão tumoral situado no braço curto do cromossomo 17 com função protetora da estrutura do DNA. O produto desse gene é uma fosfoproteína de 53kDa com capacidade de se ligar especificamente ao DNA e ativar a transcrição (Soussi e cols., 2000). A proteína selvagem, não mutada, tem efeito inibitório na proliferação e transformação celular. Frente a danos no DNA, a p53 leva a uma parada do ciclo celular na fase de transição de G1 para S, o que permite à célula reparar a integridade do seu genoma. Quando os danos no DNA são irreversíveis e não podem ser reparados, a p53 induz a célula a entrar em apoptose. Mutações do gene da p53 alteram significativamente a sua atividade de supressão tumoral (Adimoolam e Ford, 2003). Uma alta proporção de células com proteína mutante indica uma maior agressividade

tumoral (Soussi e cols., 2000). A p53 selvagem é encontrada em baixas concentrações no núcleo celular e tem uma vida média de 15 a 20 minutos. Este curto prazo de tempo impossibilita a sua detecção através da técnica de IH; contudo, a p53 mutada não sendo degradada, acumula-se na célula pelo aumento de sua vida média (várias horas) permitindo, assim, sua detecção através da utilização de anticorpos monoclonais anti-p53 (Soussi e cols., 2000).

Os mecanismos do funcionamento normal da p53 e como os mesmos são alterados durante a tumorigênese ainda não são completamente compreendidos. A relação entre a p53 e a carcinogênese tem sido comprovada através do elevado número de mutações de seu gene em tumores malignos de diferentes tecidos do organismo (Soussi e cols., 2000). Mais de 50% dos tumores malignos apresentam mutação pontual em um dos alelos do p53 e perda do outro. Essas mutações podem se dar devido a fatores ambientais (por exemplo dieta, poluição, fumo) ou genéticos (Queipo-Zaragoza e cols., 2007). A função protetora da p53 diminui com o aumento da idade, gerando uma incapacidade da célula de responder a agentes estressantes e contribuindo para o surgimento de tumores (Feng e cols., 2007). A p53 tem sido estudada como elemento potencializador dos efeitos de terapias adjuvantes como a quimioterapia e radioterapia, com o objetivo de analisar seu potencial para utilização clínica (Hollstein e cols., 1991).

1.3.1. Proteína p53 em meningiomas

Tem sido descrito o papel da p53 na diferenciação de meningiomas. Matsuno e cols. (1996), estudando 51 meningiomas, encontraram aproximadamente 20% de positividade IH da proteína p53 (Matsuno e cols., 1996). Konstantinidou e cols. (1998), encontraram 32,6% de positividade IH para p53 estudando 52 meningiomas (Konstantinidou e cols., 1998). Cho e colaboradores (1999), em 41 meningiomas, encontrou 43,9% de positividade IH para a p53, dos quais 9,5% do grau I, 72,7% do grau II e 88,9% do grau III, sendo significativamente maior a expressão IH da p53 em meningiomas de maior grau de malignidade (Cho e cols., 1999). Lanzafame e colegas (2000) estudaram 69 meningiomas, encontrando expressão IH da p53 em 57% dos casos, com maior expressão nos meningiomas atípicos e malignos em relação aos benignos (Lanzafame e cols., 2000). Estudo semelhante conduzido por Amatya e colaboradores, em 146 meningiomas, verificaram 19,8% de positividade da p53, sendo que poucos benignos apresentaram expressão da proteína, os anaplásicos expressaram a p53 na maioria dos casos e os atípicos mostraram expressão intermediária, com diferença estatisticamente significativa da expressão da proteína p53 entre os graus histológicos (Amatya e cols., 2001). Karamitopoulou e cols. (1998), em estudo com 60 meningiomas, encontraram expressão IH da p53 em 31,6%, sendo 10,8% dos meningiomas grau I, 50% dos grau II e 77% dos grau III, demonstrando expressão significativamente maior nos atípicos e anaplásicos (Karamitopoulou e cols., 1998).

Por conseguinte, a elevada taxa de recorrência dos meningiomas leva a estudos nos quais se busquem não só alvos de terapias, mas também

marcadores tumorais relevantes para seu acompanhamento, uma vez que ainda permanecem controvérsias em relação à gênese e desenvolvimento dos meningiomas.

Referências bibliográficas

Adams EF, Schrell UM, Fahlbusch R, Thierauf P. Hormonal dependency of cerebral meningiomas. Part 2: In vitro effect of steroids, bromocriptine, and epidermal growth factor on growth of meningiomas. *J Neurosurg.* 1990 Nov;73(5):750-5.

Adimoolam S, Ford JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2003 Sep 18;2(9):947-54.

Amatya VJ, Takeshima Y, Sugiyama K, Kurisu K, Nishisaka T, Fukuhara T, et al. Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol.* 2001 Sep;32(9):970-5.

Barbosa-Coutinho LM, Hilbig, A. Patologia dos Meningiomas. In: Aguiar PHP, Ramina R; Veiga JCE; Tella Jr O. Meningiomas – Diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico – aspectos gerais. 1ª edição. Brasil: Revinter; 2006. p. 11-14.

Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev.* 2001 Dec;22(6):724-63.

Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res.* 1993 Mar 15;53(6):1312-6.

Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Black PM. Progesterone and glucocorticoid receptor activation in meningiomas. *Neurosurgery.* 1995 Jul;37(1):92-7.

Carroll RS, Schrell UM, Zhang J, Dashner K, Nomikos P, Fahlbusch R, et al. Dopamine D1, dopamine D2, and prolactin receptor messenger ribonucleic acid expression by the polymerase chain reaction in human meningiomas. *Neurosurgery.* 1996 Feb;38(2):367-75.

Castelo-Branco C, Martinez MJ, Balasch J. Further data favouring hormonal dependency of cerebral meningiomas: evidence from a patient treated with cabergoline. *Gynecol Endocrinol.* 2011 Feb;27(2):134-7.

Cho H, Ha SY, Park SH, Park K, Chae YS. Role of p53 gene mutation in tumor aggressiveness of intracranial meningiomas. *J Korean Med Sci.* 1999 Apr;14(2):199-205.

Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP. The molecular genetics of meningiomas. *Brain Pathol.* 1990 Sep;1(1):19-24.

Custer B, Longstreth WT, Jr., Phillips LE, Koepsell TD, Van Belle G. Hormonal exposures and the risk of intracranial meningioma in women: a population-based case-control study. *BMC Cancer.* 2006;6:152.

Davis FG, Kupelian V, Freels S, McCarthy B, Surawicz T. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups. *Neuro Oncol.* 2001 Jul;3(3):152-8.

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol.* 2012 Nov;14 Suppl 5:v1-49.

Feng Z, Hu W, Teresky AK, Hernando E, Cordon-Cardo C, Levine AJ. Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 16;104(42):16633-8.

Friend KE, Radinsky R, McCutcheon IE. Growth hormone receptor expression and function in meningiomas: effect of a specific receptor antagonist. *J Neurosurg.* 1999 Jul;91(1):93-9.

Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1993;16:299-321.

Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Meningiomas and hormonal receptors. Immunohistochemical study in typical and non-typical tumors. *Arq Neuropsiquiatr.* 1998 Jun;56(2):193-9.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul 5;253(5015):49-53.

Karamitopoulou E, Perentes E, Tolnay M, Probst A. Prognostic significance of MIB-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. *Hum Pathol.* 1998 Feb;29(2):140-5.

Kleihues P, Sobin LH. World Health Organization classification of tumors. *Cancer.* 2000 Jun 15;88(12):2887.

Konstantinidou AE, Pavlopoulos PM, Patsouris E, Kaklamanis L, Davaris P. Expression of apoptotic and proliferation markers in meningiomas. *J Pathol.* 1998 Nov;186(3):325-30.

Koper JW, Markstein R, Kohler C, Kwekkeboom DJ, Avezaat CJ, Lamberts SW, et al. Somatostatin inhibits the activity of adenylate cyclase in cultured human meningioma cells and stimulates their growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Mar;74(3):543-7.

Kunert-Radek J, Stepień H, Radek A, Pawlikowski M. Somatostatin suppression of meningioma cell proliferation in vitro. *Acta Neurol Scand.* 1987 Jun;75(6):434-6.

Lamszus K. Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004 Apr;63(4):275-86.

Lanzafame S, Torrisi A, Barbagallo G, Emmanuele C, Alberio N, Albanese V. Correlation between histological grade, MIB-1, p53, and recurrence in 69 completely resected primary intracranial meningiomas with a 6 year mean follow-up. *Pathol Res Pract*. 2000;196(7):483-8.

Leaes CG, Meurer RT, Coutinho LB, Ferreira NP, Pereira-Lima JF, da Costa Oliveira M. Immunohistochemical expression of aromatase and estrogen, androgen and progesterone receptors in normal and neoplastic human meningeal cells. *Neuropathology*. 2010 Feb 1;30(1):44-9.

Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, et al. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 1;90(19):8861-5.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug 114(2):97-109.

Matsuno A, Nagashima T, Matsuura R, Tanaka H, Hirakawa M, Murakami M, et al. Correlation between MIB-1 staining index and the immunoreactivity of p53 protein in recurrent and non-recurrent meningiomas. *Am J Clin Pathol*. 1996 Dec;106(6):776-81.

Milenkovic S, Berisavac J, Cvetkovic-Dozic D, Skender-Gazibara M, Bojovic V, Berisavac I. Hormone receptors in benign intracranial meningiomas. *J BUON*. 2004 Jul-Sep;9(3):295-8.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 1998 Jan;78(1):189-225.

Moss J, DeCastro R, Patronas NJ, Taveira-DaSilva A. Meningiomas in lymphangioliomyomatosis. *JAMA*. 2001 Oct 17;286(15):1879-81.

Olson JJ, Beck DW, Schlechte J, Loh PM. Hormonal manipulation of meningiomas in vitro. *J Neurosurg*. 1986 Jul;65(1):99-107.

Pitella JR, S; Hahn, MD; Chimelli, L; Grinberg, LT; Andrade, MPG, Heisen, H; Neder, L Sistema Nervoso. In: Luigi; Brasileiro Filho G, editor. *Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 1008-9.

Pivonello R, Matrone C, Filippella M, Cavallo LM, Di Somma C, Cappabianca P, et al. Dopamine receptor expression and function in clinically nonfunctioning pituitary tumors: comparison with the effectiveness of cabergoline treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Apr;89(4):1674-83.

Pivonello R, Ferone D, Lombardi G, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ. Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol*. 2007 Apr;156 Suppl 1:S13-21.

Queipo-Zaragoza JA, Ruiz-Cerda JL, Vera-Donoso CD, Vera-Sempere F, Budia-Alba A, Jimenez-Cruz JF. Prognostic value of p53, Ki-67, microstaging and microvessel density in pT1G3 bladder tumors: creation of risk groups for progression. *Scand J Urol Nephrol*. 2007;41(4):283-9.

Reubi JC, Maurer R, Klijn JG, Stefanko SZ, Foekens JA, Blaauw G, et al. High incidence of somatostatin receptors in human meningiomas: biochemical characterization. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986 Aug;63(2):433-8.

Roelvink NC, Kamphorst W, van Alphen HA, Rao BR. Pregnancy-related primary brain and spinal tumors. *Arch Neurol*. 1987 Feb;44(2):209-15.

Santana Jr, PA, Marie, SKN; Aguiar, PHP. Biologia molecular dos meningiomas: um caminho promissor para a sua abordagem? . In: Aguiar PHP, Ramina R; Veiga JCE; Tella Jr O. Meningiomas – Diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico – aspectos gerais. 1ª edição. Brasil: Revinter; 2006. p. 11-14.

Sanson M, Cornu P. Biology of meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 2000;142(5):493-505.

Schrell UM, Fahlbusch R, Adams EF, Nomikos P, Reif M. Growth of cultured human cerebral meningiomas is inhibited by dopaminergic agents. Presence of high affinity dopamine-D1 receptors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Dec;71(6):1669-71.

Schrell UM, Nomikos P, Fahlbusch R. Presence of dopamine D1 receptors and absence of dopamine D2 receptors in human cerebral meningioma tissue. *J Neurosurg*. 1992 Aug;77(2):288-94.

Senogles SE. The D2s dopamine receptor stimulates phospholipase D activity: a novel signaling pathway for dopamine. *Mol Pharmacol*. 2000 Aug;58(2):455-62.

Smith FP, Slavik M, MacDonald JS. Association of breast cancer with meningioma: report of two cases and review of the literature. *Cancer*. 1978 Oct;42(4):1992-4.

Soussi T, Dehouche K, Beroud C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat*. 2000;15(1):105-13.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000 Jan;24(1):125-32.

Wahab M, Al-Azzawi F. Meningioma and hormonal influences. *Climacteric*. 2003 Dec;6(4):285-92.

2. Objetivos

Geral

Avaliar a imunorreatividade da proteína p53 e do receptor dopaminérgico D₂ em meningiomas, relacionando com gênero, idade e grau tumoral

Específicos

- a) Avaliar a expressão IH dos receptores dopaminérgicos D₂ em meningiomas;
- b) Avaliar a expressão IH da proteína p53 em meningiomas;
- c) Relacionar a expressão da proteína p53 com idade, gênero e graduação anátomo-patológica dos meningiomas;
- d) Relacionar a expressão do receptor dopaminérgico D₂ com idade, gênero e graduação anátomo-patológica dos meningiomas;
- e) Relacionar a expressão IH da proteína p53 com a expressão IH do receptor dopaminérgico D₂ em meningiomas.

3. Artigo científico redigido em inglês

High Immunohistochemical Expression of Dopamine D₂ Receptor and p53 Protein in Meningiomas: Relation to Gender, Age, and Tumor Grade

Geraldine Trott^{1,2}, Julia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima^{1,2}, Carolina Garcia Soares Leães^{1,2}, Nelson Pires Ferreira², Lígia Maria Barbosa-Coutinho¹, Miriam da Costa Oliveira^{1,2}

¹ Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite, 245 – CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Neuroendocrinology Center, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre/UFCSPA, Rua Professor Anes Dias, 285 – CEP 90020-090, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Geraldine Trott

Rua Gaston Englert, 715/472

CEP 91360-210, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: + 55 51 8450.0162 / 3026.4485

E-mail: dineca2105@gmail.com

Short running title: DR-D₂ and p53 protein in meningiomas

ABSTRACT

Background: Meningiomas are common, usually benign tumors, with a high rate of postoperative recurrence. However, the genesis and development of these tumors remain controversial. **Objective:** To investigate the presence and implications of a mutated p53 protein and dopamine D₂ receptor in a representative series of meningiomas and relate these findings with age, gender, and tumor grade. **Methods:** Tumor tissue samples of 157 patients diagnosed with meningioma (37 men and 120 women; mean age, 53.6±14.3 years) who underwent surgical resection between 2003 and 2012 at our institution were evaluated by immunohistochemistry for the presence of p53 protein and dopamine D₂ receptor. **Results:** Tumors were classified as grade I (n=141, 89.8%), grade II (n=13, 8.3%), and grade III (n=3, 1.9%). Dopamine D₂ receptor was positive in 93.6% of the cases, and p53 protein expression was detected in 49.7% of the cases. None of the markers showed significant expression differences between tumor grades. **Conclusion:** Our findings highlight the potential role of p53 protein in the development and/or progression of meningiomas. The high positivity of dopamine D₂ receptor observed in this study warrants further investigation of the therapeutic potential of dopamine agonists in the evolution of meningiomas.

Keywords: Receptors, Dopamine D₂; Immunohistochemistry; Meningioma; Meningeal Neoplasms; Tumor Suppressor Protein p53.

INTRODUCTION

Meningiomas account for approximately 35% of all intracranial neoplasms, with an annual incidence of approximately 7.22 cases per 100,000 individuals. The peak incidence is between the sixth and seventh decades of life, afflicting women more often than men (female-to-male ratio, 2:1).¹ Most meningiomas, 90–95% of cases, are benign in nature, 5–7% are atypical, and 2% are malignant.² These tumors have a high recurrence rate, reaching up to 50% after non-complete surgical resection.³

Several hormones have been implicated as predisposing factors to the development of meningiomas. Meningiomas express androgen receptors,⁴ estrogen and progesterone receptors,⁵ and nonsteroidal hormone receptors, including receptors for growth hormone,⁶ somatostatin,⁷ and dopamine.^{8,9}

Dopamine receptors are prominent in the central nervous system and divided into five subtypes, D₁ to D₅. The D₁ and D₅ receptors are members of the D₁-like family, and the D₂, D₃ and D₄ receptors are members of the D₂-like family. The definition of these groups is based on their relationship with transduction mechanisms. Activation of D₁-like family receptors stimulate the enzyme adenylate cyclase and increase intracellular levels of cAMP (3',5'-cyclic adenosine monophosphate), while those in the D₂-like family inhibit this enzyme and decrease the intracellular concentration of cAMP. The short (D_{2S}) and long (D_{2L}) isoforms of dopamine D₂ receptor also activate pathways involved in the regulation of cell growth, differentiation and apoptosis.¹⁰ In studies with rat pituitary tumor cells, dopamine agonists have shown an antiproliferative effect, inducing cell death and apoptosis through the activation of D₂ receptors.^{11,12} Other studies have

shown antiproliferative effects of the dopamine agonist bromocriptine in cultured meningioma cells.^{8,13}

Mutations in the p53 protein gene, a tumor suppressor protein, are common in different types of human tumors.¹⁴ The presence of p53 gene mutations in the genesis of meningiomas is controversial, with a high immunohistochemical expression rate of the mutated protein in atypical and malignant meningiomas, but a low rate in benign tumors.¹⁵

This study aimed to investigate the immunohistochemical expression of p53 protein and dopamine D₂ receptor in meningiomas and relate these findings with age, gender, and histologic tumor grade.

MATERIALS AND METHODS

The study sample included tumor tissue specimens obtained from 157 patients with an anatomopathologic diagnosis of meningioma who underwent surgical resection, performed by the same surgeon (NPF), at Hospital São José, Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, southern Brazil, between January 2003 and December 2012. In the case of reintervention in the same patient, specimens from the first surgery were used. Tumors were classified according to the World Health Organization (WHO) criteria for histological subtypes and tumor grading (grade I–III).¹⁶ Patients' medical records were reviewed for data collection. The study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brazil (Report No. 114/03), and was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients before inclusion in the study, and patient anonymity was preserved.

Immunohistochemistry

For immunohistochemical analysis, tumor tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Blocks were sectioned at 4 μ m, deparaffinized, and rehydrated. The streptavidin-biotin method (LSAB kit + Peroxidase; Dako, Carpinteria, CA, USA) was used for detection of p53 protein (anti-p53 monoclonal antibody, clone DO-7, 1:100 dilution; Dako, Carpinteria, CA, USA; catalog No. M7001) and dopamine D₂ receptor (anti-DRD2 polyclonal antibody, 1:150 dilution; Chemicon, Temecula, CA, USA; catalog No. AB5084P). Normal human pituitary tissue was used as a positive control for dopamine D₂ receptor and breast tissue for p53 protein.^{17,18} As a negative control, antibodies were replaced with normal saline. The anti-DRD2 polyclonal antibody can recognize both isoforms (D_{2S} and D_{2L}) of receptor D₂.

Positivity criterion for intracellular dopamine D₂ receptor and p53 protein was the presence of at least one group of cells with clearly marked cytoplasm or nucleus, respectively.^{5,18} Specimens were analyzed by two independent observers under light microscopy.

Statistical analysis

Age, according to the symmetry determined by the Kolmogorov-Smirnov test, was expressed as mean $\pm$ SD and compared between immunohistochemistry groups (positive or negative) using the Student *t* test. Categorical variables were compared using the chi-square test with Fisher's correction. The level of significance was set at 5%. Data analysis was conducted using the Statistical

Package for the Social Sciences (SPSS), version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Of 157 patients, 120 were women (76.4%), resulting in a female-to-male ratio of 3:1. Mean patient age was 53.6 ± 14.3 years. According to the WHO grading scheme, 141 (89.8%) meningiomas were classified as grade I, 13 (8.3%) as grade II, and three (1.9%) as grade III. The histological subtypes were transitional (n=69, 43.9%), meningothelial (n=27, 17.2%), fibroblastic (n=19, 12.1%), psammomatous (n=14, 8.9%), atypical (n=13, 8.3%), angiomatous (n=6, 3.9%), microcystic (n=3, 1.9%), secretory (n=3, 1.9%), anaplastic (n=2, 1.3%), and rhabdoid (n=1, 0.6%).

Seventy-eight (49.7%) meningiomas stained positive for p53 protein. An example of a case positive for p53 protein is shown in Figure 1A. The p53 protein was positive in 66 of 141 (46.8%) grade I tumors, in 11 of 13 (84.6%) grade II tumors, and in 1 of 3 (33.3%) grade III tumors, with no statistically significant differences in positivity among tumor grades. However, meningiomas with higher grades of malignancy (grade II and III) displayed a tendency to show a higher p53 protein expression rate ($p=0.06$).

Regarding gender, 57 (47.5%) of samples from women and 21 (56.8%) from men stained positive for p53 protein, with no statistically significant differences between groups ($p>0.05$). Mean age was significantly higher in patients showing positive p53 immunostaining compared to patients with negative p53 immunostaining (55.9 vs. 51.4 years; $p=0.04$).

As for dopamine D₂ receptor, 147 (93.6%) meningiomas stained positive (Figure 1B). Positivity percentages according to tumor grade were 93.6% for grade I, 100% for grade II, and 66.6% for grade III tumors, with no statistically significant differences among tumor grades. There were no statistically significant differences in positivity between genders (93.3% of women and 94.6% of men) or mean patient age (53.9 vs. 49.0 years) ($p>0.05$).

Seventy-five (47.7%) tumors were simultaneously positive for dopamine D₂ receptor and p53 protein. These tumors had higher histological malignancy compared to meningiomas that was not positive for both markers ($n=82$, 52.2%), with a statistically significant difference ($p=0.021$).

DISCUSSION

The present study analyzed a representative series of meningiomas, which is consistent with data reported in the literature regarding age of incidence and prevalence in female patients^{1,19} as well as greater occurrence of grade I tumors.^{2,20}

The p53 protein functions as a tumor suppressor, acting as a protector of DNA. In the presence of irreversible damage, the p53 tumor suppressor gene protein induces cell apoptosis. The wild-type protein has an inhibitory effect on cell proliferation and transformation, but gene mutations change its tumor suppressor activity.²¹ A high proportion of cells with mutant protein indicate increased tumor aggressiveness.²²

With regard to p53 expression in meningiomas, Matsuno *et al.*²³ studied 51 meningiomas and found approximately 20% of immunopositivity. Cho *et al.*,¹⁵ in 41 meningiomas, found 43.9% positive immunoreactivity for p53 (9.5% of grade I,

72.7% of grade II, and 88.9% of grade III meningiomas), and this immunoreactivity was higher in tumors with higher histological malignancy. Lanzafame *et al.*²⁴ examined 69 meningiomas immunohistochemically and found expression of p53 protein in 57% of cases, being higher in atypical and malignant than in benign meningiomas. Amatya *et al.*²⁵ analyzed 146 meningiomas and found positive expression of p53 protein in 19.8% of cases; of these, few benign meningiomas had p53 protein expression, anaplastic meningiomas expressed p53 protein in most cases, and atypical meningiomas had p53 labeling indexes in an intermediate range, with statistically significant expression differences among them. Karamitopoulou *et al.*²⁶ examined 60 meningiomas and found positive p53 protein expression in 31.6% of cases – 10.8% of grade I, 50% of grade II, and 77% of grade III tumors, with significantly higher p53 expression in atypical and anaplastic meningiomas ($p=0.000003$). In our series, approximately 50% of cases showed positive p53 protein expression, which is consistent with the range from 19.8 to 57% reported in the literature.^{15,23-26} In contrast to the findings of higher p53 expression in atypical and anaplastic (grade II and III) meningiomas reported in those studies, in our series there was only a trend to this result ($p=0.06$).

The protective function of the p53 protein declines with age, a decline that may lead to cell inability to respond to stressors and a consequent increased tumor incidence.²⁷ Similarly, in our study we found a significantly higher mean age among patients with p53 positively stained cells. On the other hand, we found no significant association between p53 protein expression and gender, which is in agreement with the findings of Amatya *et al.*²⁵

Activation of dopamine D₂ receptor induces several pathways involved in the regulation of cell metabolism, growth, differentiation and apoptosis, especially

the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and/or extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. This activation has been associated with antiproliferative effects.¹⁰

Dopamine and its agonists, bromocriptine (predominant action on D₂ receptor), apomorphine (D₁ and D₂), and SKF-38393 (D₁ agonist), at micromolar concentrations, lead to a significant decrease in the proliferation rate of meningioma cells in culture.⁸ Incubation of meningioma cells with bromocriptine has shown significant inhibition of cell proliferation, ranging from 25 to 56%, and the higher the concentration of bromocriptine, the greater the inhibition rate.¹³ More recently, Castelo-Branco *et al.*²⁸ reported the case of a patient with recurrent meningioma who responded well to treatment with cabergoline (a dopamine agonist acting predominantly via D₂ receptors), with no compressive symptoms or increase in the neoplasm 11 years after treatment, suggesting that the proliferation of meningioma cells may be, to some extent, under dopaminergic control.

The evaluation of the presence of dopamine D₂ receptor in meningiomas has been shown to be negative by the Scatchard analysis,^{9,29} detectable in some cases by the Northern blot analysis,⁹ and positive in 100% of cases using the polymerase chain reaction (PCR) assay, in which the sequences of dopamine D₂ receptor were identical to those of the Genbank™.⁹ In the present study, in accordance with a previous study,²⁶ we chose a qualitative method for immunohistochemical analysis, given the syncytial features observed in these neoplasms,³⁰ and detected 93.6% immunopositivity for dopamine D₂ receptor. In this series, we found no statistically significant association of the immunohistochemical expression of dopamine D₂ receptor with gender or patient age. So far, there are no reports of data related to the immunohistochemical

expression of dopamine D₂ receptors in meningiomas, preventing comparison of results.

In conclusion, the present findings support the role of p53 protein in the development and/or progression of meningiomas. Moreover, the presence of dopamine D₂ receptor in over 90% of the meningioma samples analyzed, including samples with higher histological malignancy, warrants further investigation of the therapeutic potential of dopaminergic agents in the treatment of these tumors.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- 1 Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 2012; **14**(Suppl 5):v1–v49.
- 2 Santana Jr PA, Marie SKN, Aguiar PHP. Biologia molecular dos meningiomas: um caminho promissor para a sua abordagem? In: Aguiar PHP, Ramina R, Veiga JCE, Tella Jr O, eds. *Meningiomas – Diagnóstico e tratamento clínico e cirúrgico: aspectos gerais*, 1st edn. Rio de Janeiro: Revinter, 2006; 11–14.
- 3 Wahab M, Al-Azzawi F. Meningioma and hormonal influences. *Climacteric* 2003; **6**: 285–292.
- 4 Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Wilson EM, Black PM. Androgen receptor expression in meningiomas. *J Neurosurg* 1995; **82**: 453–460.
- 5 Leães CG, Meurer RT, Coutinho LB, Ferreira NP, Pereira-Lima JF, da Costa Oliveira M. Immunohistochemical expression of aromatase and estrogen, androgen and progesterone receptors in normal and neoplastic human meningeal cells. *Neuropathology* 2010; **30**: 44–49.
- 6 Friend KE, Radinsky R, McCutcheon IE. Growth hormone receptor expression and function in meningiomas: effect of a specific receptor antagonist. *J Neurosurg* 1999; **91**: 93–99.
- 7 Reubi JC, Maurer R, Klijn JG *et al*. High incidence of somatostatin receptors in human meningiomas: biochemical characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **63**: 433–438.
- 8 Schrell UM, Fahlbusch R, Adams EF, Nomikos P, Reif M. Growth of cultured human cerebral meningiomas is inhibited by dopaminergic agents. Presence of

high affinity dopamine-D1 receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **71**: 1669–1671.

9 Carroll RS, Schrell UM, Zhang J *et al*. Dopamine D1, dopamine D2, and prolactin receptor messenger ribonucleic acid expression by the polymerase chain reaction in human meningiomas. *Neurosurgery* 1996; **38**: 367–375.

10 Pivonello R, Ferone D, Lombardi G, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ. Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 2007; **156**(Suppl 1): S13–S21.

11 An JJ, Cho SR, Jeong DW, Park KW, Ahn YS, Baik JH. Anti-proliferative effects and cell death mediated by two isoforms of dopamine D2 receptors in pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 2003; **206**: 49–62.

12 Kanasaki H, Fukunaga K, Takahashi K, Miyazaki K, Miyamoto E. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase activation in bromocriptine-induced apoptosis in rat pituitary GH3 cells. *Biol Reprod* 2000; **62**: 1486–1494.

13 Adams EF, Schrell UM, Fahlbusch R, Thierauf P. Hormonal dependency of cerebral meningiomas. Part 2: In vitro effect of steroids, bromocriptine, and epidermal growth factor on growth of meningiomas. *J Neurosurg* 1990; **73**: 750–755.

14 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; **253**: 49–53.

15 Cho H, Ha SY, Park SH, Park K, Chae YS. Role of p53 gene mutation in tumor aggressiveness of intracranial meningiomas. *J Korean Med Sci* 1999; **14**: 199–205.

16 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD *et al*. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; **114**: 97–109.

- 17 Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Buchfelder M, Fahlbusch R, Lancranjan L. Dopamine D2 receptor gene expression in human adenohypophyseal adenomas. *Endocrine* 2001; **14**: 329–336.
- 18 Meurer RT, Martins DT, Hilbig A *et al.* Immunohistochemical expression of markers Ki-67, neuron, synaptophysin, p53 and HER2 in medulloblastoma and its correlation with clinicopathological parameters. *Arq Neuropsiquiatr* 2008; **66**: 385–390.
- 19 Pitella Jr S, Hahn MD, Chimelli L *et al.* Sistema Nervoso. In: Brasileiro Filho G, ed. *Bogliolo Patologia*, 8th edn. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011; 1008–1009.
- 20 Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Meningiomas and hormonal receptors. Immunohistochemical study in typical and non-typical tumors. *Arq Neuropsiquiatr* 1998; **56**: 193–199.
- 21 Adimoolam S, Ford JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2003; **2**: 947–954.
- 22 Soussi T, Dehouche K, Bérout C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* 2000; **15**: 105–113.
- 23 Matsuno A, Nagashima T, Matsuura R *et al.* Correlation between MIB-1 staining index and the immunoreactivity of p53 protein in recurrent and non-recurrent meningiomas. *Am J Clin Pathol* 1996; **106**: 776–781.
- 24 Lanzafame S, Torrisi A, Barbagallo G, Emmanuele C, Alberio N, Albanese V. Correlation between histological grade, MIB-1, p53, and recurrence in 69 completely resected primary intracranial meningiomas with a 6 year mean follow-up. *Pathol Res Pract* 2000; **196**: 483–488.

- 25 Amatya VJ, Takeshima Y, Sugiyama K *et al.* Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol* 2001; **32**: 970–975.
- 26 Karamitopoulou E, Perentes E, Tolnay M, Probst A. Prognostic significance of MIB-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. *Hum Pathol* 1998; **29**: 140–145.
- 27 Feng Z, Hu W, Teresky AK, Hernando E, Cordon-Cardo C, Levine AJ. Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 16633–16638.
- 28 Castelo-Branco C, Martinez MJ, Balasch J. Further data favouring hormonal dependency of cerebral meningiomas: evidence from a patient treated with cabergoline. *Gynecol Endocrinol* 2011; **27**: 134–137.
- 29 Schrell UM, Nomikos P, Fahlbusch R. Presence of dopamine D1 receptors and absence of dopamine D2 receptors in human cerebral meningioma tissue. *J Neurosurg* 1992; **77**: 288–294.
- 30 Russell DS, Rubinstein LJ. *Pathology of tumours of the nervous system*, 5th edn. London: Edward Arnold, 1989.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Representative figures of immunohistochemical stains. (A) p53 protein: positive nuclear expression (arrows) in meningothelial meningioma (400 X); (B) Dopamine D₂ receptor: positive cytoplasmic expression (arrows) in meningioma (400 X).

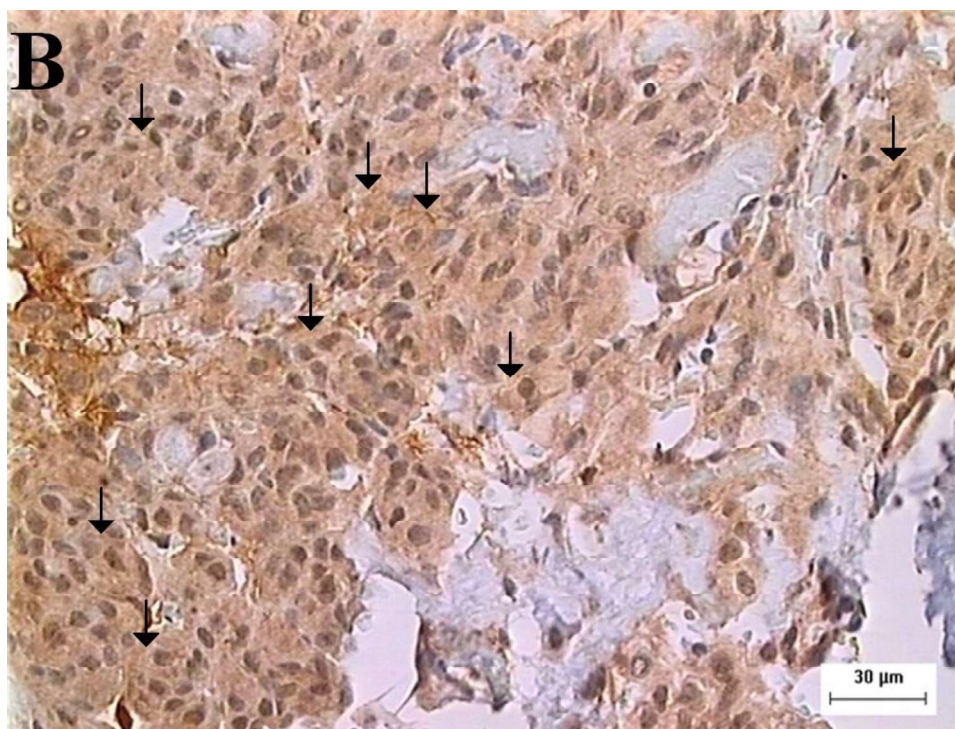
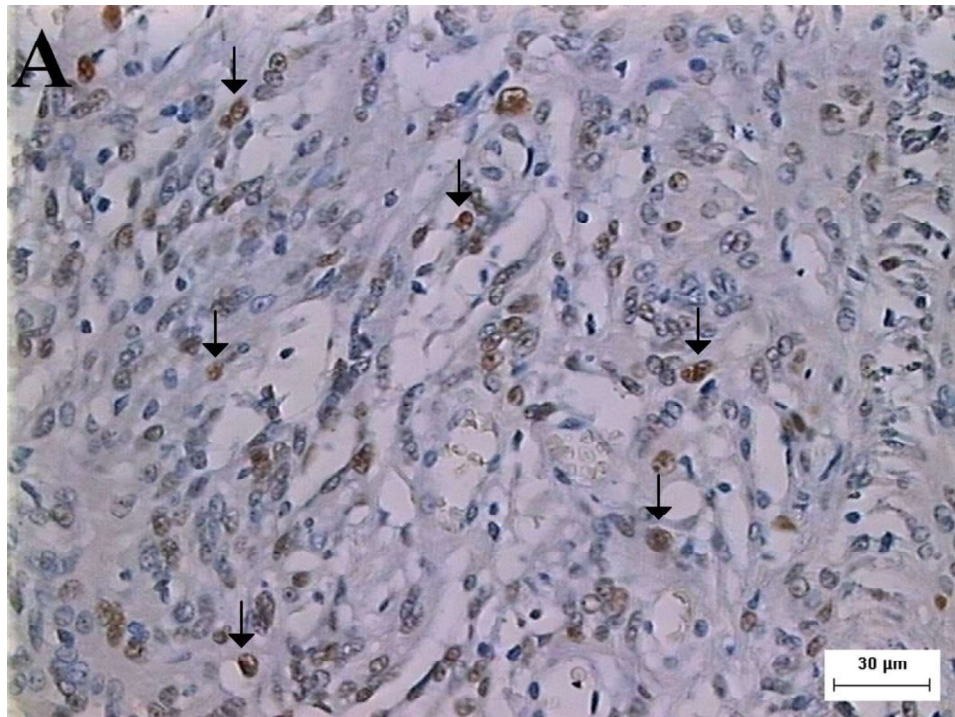
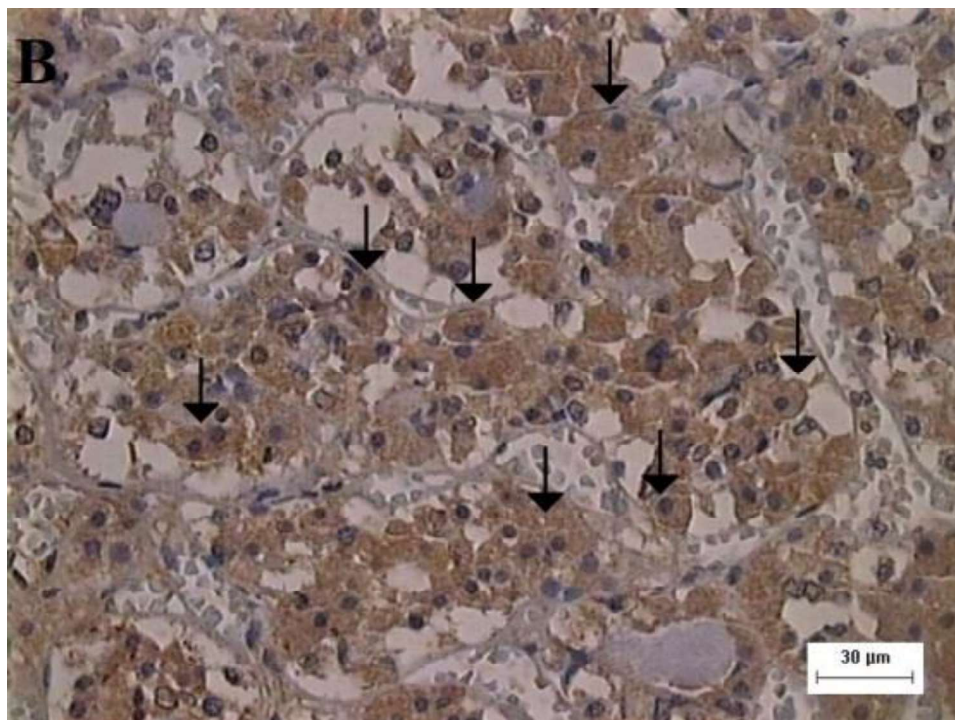
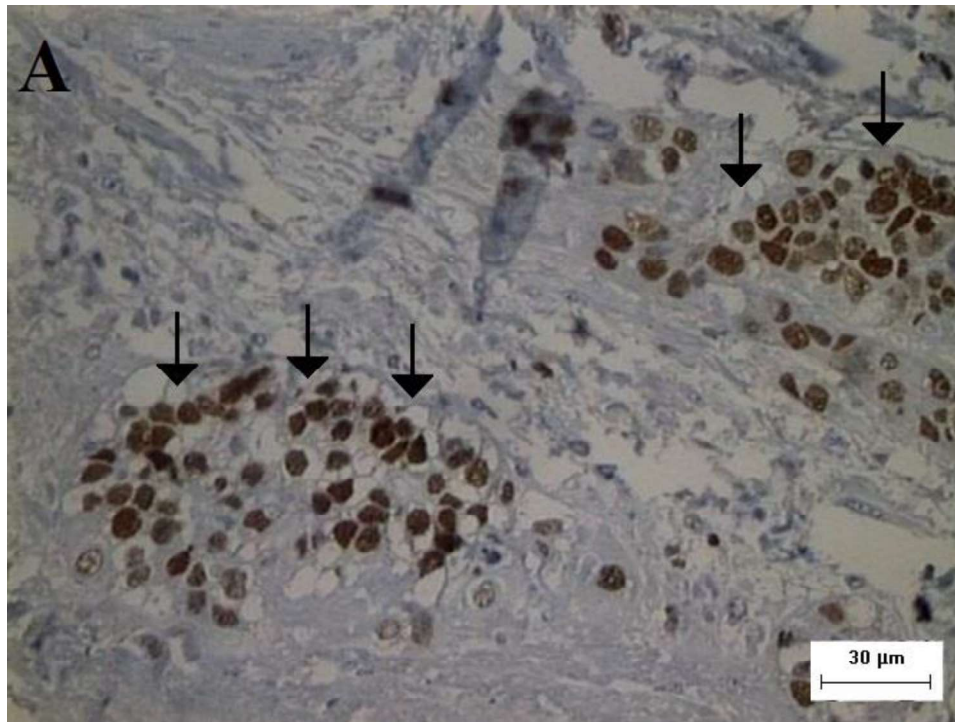


Figure 2. Representative figures of positive controls. (A) p53 protein positive control (arrows) (400 X). (B) Dopamine D₂ receptor positive control (arrows) (400 X)



4. Considerações finais

Aproximadamente metade dos meningiomas analisados expressam a proteína p53. Há alto grau de expressão IH do receptor de dopamina D₂. A expressão IH da proteína p53 mostrou-se significativamente maior nos pacientes mais idosos, assim como nos meningiomas atípicos e anaplásicos com positividade para o DR-D₂. Diante dessa predominância nos meningiomas com maiores características de malignidade e também nos pacientes de maior idade, a positividade para a p53 pode auxiliar na determinação do grau tumoral e servir como elemento prognóstico complementar no tratamento dos meningiomas. A imunorreatividade para o receptor de dopamina D₂ pode servir como alvo de terapias complementares, uma vez que o uso de agonistas desse receptor está relacionado com a diminuição da proliferação celular nessas neoplasias.

Com base nestes achados, mais estudos são necessários para ampliar o conhecimento em relação à biologia dos meningiomas e possíveis implicações na terapêutica dos mesmos.

5. Anexos

5.1. Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre conforme parecer substanciado nº 114/03 e está de acordo com as normas brasileiras estabelecidas para pesquisas com seres humanos. Foram respeitados os requisitos quanto a confidencialidade das informações de acordo com determinação feita pela Resolução 466/12, mantendo-se o compromisso ético e legal do anonimato e sigilo dos dados dos prontuários. Todos os pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

**Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre**

Rua Prof. Amos Dias, 285 - Fone Geral: (51) 3214.8080 - Fax Geral: (51) 3214.8585 - Site: www.santacasa.org.br
CEP 91070-090 - Porto Alegre - RS - CNPJ 92815000/0001-68

PARECER CONSUBSTANCIADO**Parecer nº 114/03****Protocolo nº 623/03**

Título: "Hiperprolactinemia e Receptores de Prolactina, Dopamina e Estrógeno em tumores primários do Sistema Nervoso Central".

Pesquisador Responsável: Dra. Miriam da Costa Oliveira

Co-Investigadores: Júlia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
Caroline Boesche Aleixo
Caroline Kaercher Kramer
Arthur Azambuja Pereira Filho

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

Data de Entrada: 29/04/20003

Data da Reapresentação: 16/06/2003

Data da Reavaliação: 14/07/2003

II –Objetivos: Avaliar as concentrações séricas de prolactina em pacientes com tumores primários do SNC.

III - Sumário do Projeto

Descrição e caracterização da amostra: Pacientes internados no Hospital São José, durante os anos de 2003 e 2004. Esses pacientes responderão à anamnese de rotina, com atenção especial aos medicamentos utilizados e dados pertinentes ao eixo gonadal, conforme protocolo em anexo. No dia anterior ao procedimento cirúrgico será coletada amostra de sangue periféricos às 8:00 horas para dosagem de PRL, T4L e TSH.

Crítérios de Inclusão e Exclusão:

Serão incluídos no estudo pacientes internados no Hospital São José, com diagnóstico provável de tumor primário do SNC, submetidos à excisão cirúrgica do tumor durante os anos de 2003 e 2004. Estes pacientes responderão à rotina, com atenção especial aos medicamentos utilizados e dados pertinentes ao eixo gonadal, conforme protocolo em anexo. A amostra de sangue venoso (10ml) será coletada em região cubital após assinatura de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

IV - Comentários:

- **Justificativa do uso de placebo** – Não será utilizado no presente estudo.

**Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre**

Rua Prof. Annes Dias, 285 - Fone Geral: (51) 3214.8080 - Fax Geral: (51) 3214.8585 - Site: www.santacasa.org.br
CEP 90020-090 - Porto Alegre - RS - CNPJ 92815000/0001-68

- Análise de riscos e benefícios – Adequada.
- Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo – Adequada.
- Informação adequada quanto ao financiamento – adequada.
- Outros centros no caso de estudos multicêntricos – Não se aplica.

V - Parecer – *“Após reavaliação do projeto acima descrito o presente comitê não encontrou óbices quanto ao seu desenvolvimento em nossa Instituição”.*

VI - Data da Reunião: 03/06/2003

VII – Data da Reapresentação: 16/06/2003

VIII – Data da Reavaliação: 14/07/2003

“Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Aprovados”.

Porto Alegre, 14 de julho de 2003.

Dr. Cláudio Telöken
Coordenador do CEP/ISCOMPA



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

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



Compromisso com a excelência

PARECER Nº 064/06

Protocolo CEP nº: 623/03

Pesquisador Responsável: Dra. Mirian da Costa Oliveira

Instituição: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

O Comitê de Ética em Pesquisa da **IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE PORTO ALEGRE CEP/ISCOMPA**, no uso de suas atribuições, conforme Regimento Interno, avaliou e aprovou em 20/05/05 a solicitação de avaliação anual dos anos 2005 e 2006, ref. ao projeto intitulado, **"Hiperprolactinemia e Receptores de Prolactina, Dopamina e Estrógeno em tumores primários do Sistema Nervoso Central"**, considerando que os mesmos atendem as exigências previstas na legislação vigente do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, demonstradas através do parecer transcrito:

"Após analisarmos o andamento do estudo, tendo em vista que o mesmo está de acordo com o previsto inicialmente, o presente comitê não encontrou óbices à sua continuidade em nossa Instituição".

Membros do Comitê de Ética em Pesquisa:

- Dr. Cláudio Telöken, médico – Coordenador do CEP
- Dr. João Carlos Goldani, Médico
- Dr. Ajácio Bandeira de Mello Brandão, Médico
- Dr. Marcelo Garcia da Rocha, Vice –Coordenador do CEP
- Dra. Ana Guardiola, Médica
- Dr. Carlos Franco Voegeli, Especialista em Análises Clínicas
- Léria Rosane Holsbach, Engenheira Clínica
- Denise Scoppel, Fisioterapeuta
- Vera Maria Pescador, Advogada
- Norma Elisabeth R. Heinzelman, Usuária da Instituição
- Vera Maria Santafé, Especialista em Análises Clínicas
- Sérgio Amantéa, Médico

Porto Alegre, 20 de março de 2006.

Dr. Claudio Telöken

Coordenador do CEP- ISCOMPA

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCOMPA Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br
 Reconhecido:

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
 IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
 Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
 FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.



CENTRO DE
NEUROENDOCRINOLOGIA
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA - RS

CENTRO DE NEUROENDOCRINOLOGIA ISCMPA/UFCSPA

Ao CEP/ISCMPA

Solicito inclusão da autora Geraldine Trott no projeto intitulado "HIPERPROLACTINEMIA E RECEPTORES DE PROLACTINA, DOPAMINA E ESTRÓGENO EM TUMORES PRIMÁRIOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL", aprovado por este comitê sob o número (623/03) e pelo CEP da UFCSPA (037/05). Informo que o mesmo já gerou publicação científica em revista internacional (em anexo). À época, houve problemas na execução da técnica de imuno-histoquímica para o receptor dopaminérgico D2, a qual será aplicada agora pela acadêmica bolsista de iniciação científica Geraldine, vinculado ao PPG Patologia UFCSPA e ao Centro de Neuroendocrinologia ISCMPA/UFCSPA, sob ciência e concordância da Chefia do Laboratório do PPG em Patologia da UFCSPA. Declaro que o orçamento para a realização dos exames de imuno-histoquímica será absorvido pelo PPG Patologia UFCSPA, não havendo ônus à ISCMPA.

Porto Alegre, 24 de setembro de 2010

Atenciosamente,

Miriam da Costa Oliveira

Chefe do Centro de Neuroendocrinologia ISCMPA/UFCSPA
Reitora UFCSPA

Paula Schultz
Secretária do CEP
ISCMPA

30 SET 2010

Cronograma de atividades

Etapas	2011				2012			
	Jan-Mar	Abr-Jun	Jul-Set	Out-Dez	Jan-Mar	Abr-Jun	Jul-Set	Out-Dez
Revisão Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x
Coleta do material	x	x	x	x	x	x	x	x
Treinamento técnica IH	x							
Treinamento leitura IH		x	x					
Revisão do AP e prontuários	x	x	x	x	x	x	x	x
Execução da- Técnica de IH		x	x	x	x	x	x	
Leitura das lâminas			x	x	x	x	x	
Análise Estatística								x
Elaboração do artigo científico								x

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

CENTRO DE NEUROENDOCRINOLOGIA DA SANTA CASA/POA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Consentimento Livre e Esclarecido

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

(Nome completo do PACIENTE – preencher em letra de forma) RG/Estado

1º - Lesões na região da glândula hipófise, no sistema nervoso central, costumam se acompanhar de alterações hormonais e, entre elas, alterações nas concentrações do hormônio chamado Prolactina. Aumento deste hormônio costuma se associar com distúrbios do sistema reprodutivo, tanto no homem como na mulher. Estes distúrbios podem ser tratados com medicamentos facilmente disponíveis. Estudos científicos publicados recentemente têm citado alterações da Prolactina em pacientes com outras lesões do sistema nervoso central.

Nesse estudo, investigaremos a presença de aumento de prolactina em pacientes com vários tipos de lesões neurológicas. Para isso, os pacientes deverão submeter-se à uma coleta de sangue. A coleta será feita por um médico ou bolsista de iniciação científica envolvidos no projeto em questão.

2º - O procedimento utilizado será a coleta de 10ml de sangue venoso na região cubital, usando material descartável e estéril. Os riscos desse procedimento incluem desconforto no momento da punção, hematoma (coloração roxa) e, muito raramente, infecção no local.

3º - Os benefícios esperados com os resultados desta pesquisa são para o paciente, para outros pacientes com o mesmo tipo de lesão, e para o desenvolvimento da ciência. Se for detectado aumento da Prolactina, o paciente será tratado adequadamente pelos médicos da equipe; se for confirmado que um número significativo de pacientes apresenta o mesmo distúrbio, essa investigação poderá ser feita de rotina beneficiando muitas pessoas; também se confirmado, o achado abrirá nova frente de estudos na área.

4º - É garantido ao paciente o recebimento de resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca do estudo.

5º - Caso existirem novas perguntas sobre este estudo, sobre os direitos como participante do mesmo ou prejuízo de qualquer natureza pela participação, deve ser contatada a Dra *Miriam da Costa Oliveira* (investigadora principal) pelo telefone (051) 3224 88 22.

6º - É dada a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do Estudo, sem que isso traga prejuízo.

7º - É dada a garantia de não ser identificado e de ser mantido o caráter confidencial de informação em relação à privacidade do paciente.

8º - É assumido o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade em continuar participando.

9º - É garantido que todos os gastos de realização de exames do protocolo da pesquisa serão absorvidos pelo orçamento do estudo.

Estou ciente de que não serão violados os segredos profissionais obtidos pelo exame clínico e subsidiário aos quais me submeterei. Assino o presente documento, em duas vias de igual teor, ficando uma em minha posse, ciente de todos os benefícios e riscos descritos acima.

A minha assinatura neste *Consentimento Livre e Esclarecido* dará autorização ao coordenador do estudo, ao Comitê de Ética do hospital, e à organização governamental de saúde de utilizarem os dados obtidos quando se fizer necessário, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando minha privacidade.

Porto Alegre, _____, _____, _____.
(dia) (mês) (ano)

Assinatura do Voluntário: _____

Assinatura do(s) Médico(s) Responsáveis pelo projeto: _____

Nome da médica responsável: *Dra Miriam da Costa Oliveira*

5.2. Trabalhos apresentados em congressos

XVI Simpósio Internacional de Neuroendocrinologia SINE 2012: 12/04 a 14/04 de 2012. Belo Horizonte/MG.

- Apresentação Oral: Avaliação da Expressão Imuno-Histoquímica do Receptor de Dopamina D₂ e da Proteína p53 em Meningiomas.

- Poster

- Resumo publicado: Arq Bras Endocrinol Metab 2012;56(supl.1):S18 (OR-05): Avaliação da Expressão Imuno-Histoquímica do Receptor de Dopamina D₂ e da Proteína p53 em Meningiomas. Trott G, Pereira-Lima JFS, Leães CGS, Oliveira MC.

The Endocrine Society's 95th Annual Meeting ENDO 2013, 15 a 18 de junho 2013, São Francisco, Califórnia.

-Poster: Immunohistochemical expression of D2 dopamine receptor and p53 protein in 170 meningiomas.

-Resumo publicado: Endocr Rev (03_MeetingAbstracts): SAT-336, 2013. v. 34. Immunohistochemical expression of D2 dopamine receptor and p53 protein in 170 meningiomas. Oliveira MC, Pereira-Lima JFS, Trott G, M; Leães CGS, D'Ávila MF, Ferreira, NP

SINE 2012



Belo Horizonte, 26 de março de 2012

Prezada Dra. Júlia Fernanda Semmelmann Pereira Lima,

A Comissão Científica do **XVI SINE** agradece o envio do trabalho:

“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO RECEPTOR DE DOPAMINA D2 E DA PROTEÍNA P53 EM MENINGIOMAS”

e comunica que ele foi selecionado para ser apresentado oralmente no SINE 2012, dia 14 de abril, de 15h30 às 16h40, e recebeu o número **04**.

Pedimos a gentileza de comparecer ao mídia desk com uma hora de antecedência para testar a sua apresentação.

NORMAS DE APRESENTAÇÃO:

- 1 - Os trabalhos aprovados serão apresentados pela ordem numérica de 01 a 10.
- 2 - Cada apresentador terá 8 minutos para apresentação com 2 minutos para discussão.
- 3 - O apresentador tem que estar inscrito e quite com o SINE 2012 antes do Simpósio.

Agradecemos pela sua participação, e colocamo-nos à disposição através da secretaria executiva Suporte Eventos – 31- 3261.3873 – sine2012@suporteeventos.com.br

Cordialmente;

Marcello D. Bronstein

Presidente do SINE

Antônio Ribeiro-Oliveira Jr.

Presidente da Comissão Científica

Avaliação imuno-histoquímica do receptor de dopamina D₂ e da proteína p53 em meningiomas



Geraldine Trott¹, Carolina G. S. Leães², Miriam da Costa Oliveira²,
Nelson P. Ferreira², Marícia Fantinel D'Ávila¹, Júlia F. S. Pereira-Lima²

Orientadora: Dra Júlia F. S. Pereira-Lima

1. Programa de Pós Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFSCPA)
2. Centro de Neuroendocrinologia/Santa Casa de Porto Alegre



INTRODUÇÃO

Evidências sugerem o papel dos agonistas dopaminérgicos D₂ na redução da proliferação celular em meningiomas. (1) Já foi evidenciada a presença desses receptores em meningiomas; contudo, esses estudos ainda são insuficientes na literatura. (2) Paralelamente, já foi relatado que a determinação da expressão da proteína p53 por imuno-histoquímica (IH) pode sugerir a atividade proliferativa dos meningiomas e é capaz de servir como um preditor de recorrência futura. (3,4)

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do receptor de dopamina D₂ (DR-D₂) e da proteína p53 por imuno-histoquímica em meningiomas.

MÉTODOS

Amostras de tecido tumoral fixado em formalina e incluído em parafina de 157 pacientes diagnosticados com meningiomas (37 homens e 120 mulheres), com média de idade de 53,6 ± 14,3 anos, foram submetidas à técnica de IH para avaliação da expressão da proteína p53 e DR-D₂. Os tumores foram classificados em graus I-III de acordo com a OMS. Foram utilizados os prontuários dos pacientes para coleta de dados como sexo e idade na ocasião da cirurgia.



CENTRO DE
NEUROENDOCRINOLOGIA
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA - RS

www.ufscpa.edu.br/neuroendocrino

RESULTADOS

A expressão do DR-D₂ foi detectada em 93,6% dos casos, sem diferença estatisticamente significativa entre grau tumoral, sexo e idade. Em relação à expressão da proteína p53, 49,7% dos casos mostraram-se positivos, com média de idade dos pacientes com IH positiva significativamente maior (p=0.04). Não houve diferença estatisticamente significativa entre gêneros, idade e graduação anátomo-patológica para p53.

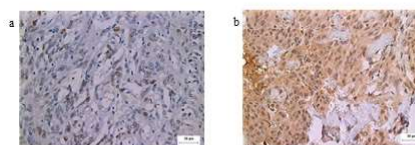


Figura 1: (a) p53: expressão nuclear positiva (setas) em um meningioma (x400); (b) DR-D₂: expressão citoplasmática positiva (setas) em um meningioma (x400)

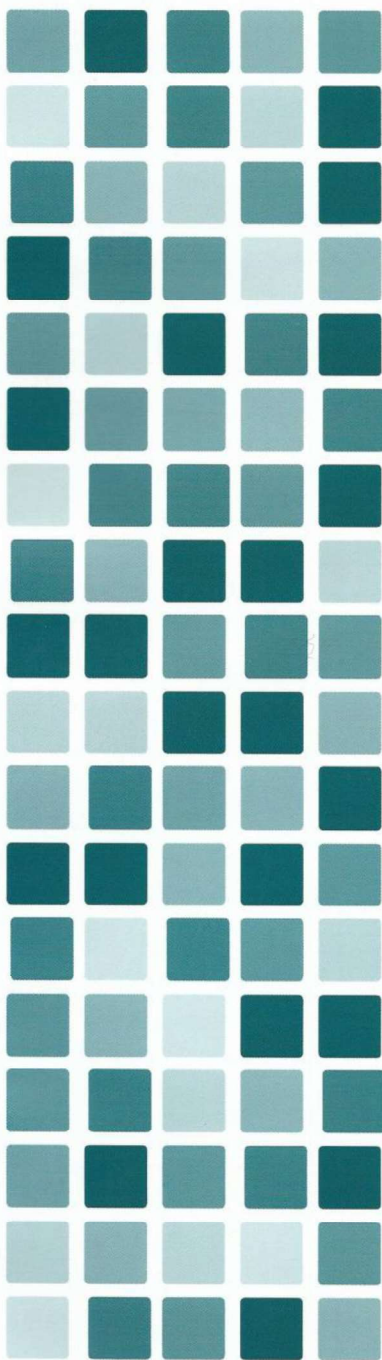
CONCLUSÃO

Há expressão IH da proteína p53 em aproximadamente metade dos meningiomas e alto grau de expressão IH do DR-D₂. A expressão IH da p53 foi aumentada com o aumento da idade. A alta expressão do DR-D₂ sugere o uso de seus agonistas em terapias complementares. Com base nestes achados, mais estudos são necessários para ampliar o conhecimento no acompanhamento destes tumores, assim como possíveis futuras implicações

REFERÊNCIAS

1. SCHRELL, U. et al. Growth of cultured human cerebral meningiomas is inhibited by dopaminergic agents. Presence of high affinity dopamine-D1 receptors. *Journal of Clinical Endocrinol Metab*, v.71, p. 1665-71, 1990.
2. CARROLL, R.S. et al. Dopamine D1, dopamine D2 and prolactin receptor messenger ribonucleic acid expression by the polymerase chain reaction in human meningiomas. *Neurosurgery*, v.38, p. 367-75, 1995.
3. AMATYA, V.J. et al. Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Human Pathology*, v.32, p. 970-975, 2001.
4. MATOUDO, A. et al. Correlation between MIB-1 staining index and the immunoreactivity of p53 protein in recurrent and non-recurrent meningiomas. *American Journal of Clinical Pathology* v.8, p. 775-81, 1996.

ISSN 0004-2730



ARQUIVOS BRASILEIROS DE ENDOCRINOLOGIA & METABOLOGIA

BRAZILIAN ARCHIVES OF ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM

XVI SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NEUROENDOCRINOLOGIA

12 A 14 DE ABRIL DE 2012
BELO HORIZONTE, MG



ABRIL 2012
56
SUPLEMENTO 1

SESSÃO ORAIS

na posição 301-302 (éxon 2), mutação essa que é bem descrita como causa de pan-hipopituitarismo. A última alteração encontrada foi no éxon 3 de LHX3: 439A>G em heterozigose. Essa mutação ainda não foi relatada na literatura. **Conclusão:** As causas genéticas do hipopituitarismo são raras. A proporção de indivíduos afetados na população estudada está de acordo com a literatura: 2/24 apresentam mutação já conhecida em PROP1, e 1/24 apresenta alteração em LHX3 ainda não relatada. É necessária a realização de estudos funcionais para definir se essa última mutação é responsável pelo desenvolvimento de hipopituitarismo.

OR04 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO RECEPTOR DE DOPAMINA D2 E DA PROTEÍNA P53 EM MENINGIOMAS

Trott G¹, Pereira-Lima JFS¹, Leões CGS¹, Oliveira MC¹, Trott G¹, Pereira-Lima JFS¹, Leões CGS¹, Oliveira MC¹

¹ Centro de Neuroendocrinologia da Santa Casa de Porto Alegre, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA)

Objetivo: O objetivo do estudo foi avaliar a expressão do receptor de dopamina D2 (DR-D2) e da proteína p53 por imunistoquímica (IH) em meningiomas. **Material e métodos:** Foram incluídas 139 amostras de tecido tumoral de pacientes diagnosticados com meningioma (31 homens e 108 mulheres) com média de idade de 53,15 anos. Os fragmentos tumorais foram fixados em formalina, incluídos em parafina e submetidos à técnica de IH para avaliação da expressão da proteína p53 e DR-D2. Os tumores foram classificados em graus I-III de acordo com a OMS. Foram obtidos dados dos prontuários dos pacientes como sexo e idade na ocasião da cirurgia. **Resultados:** A expressão do DR-D2 foi detectada em 76,97% dos pacientes, sem diferença estatisticamente significativa entre grau tumoral, sexo e idade. A expressão da proteína p53 foi detectada em 41,72% dos pacientes, sendo a média de idade dos pacientes com IH positiva significativamente maior ($p = 0,04$). Os meningiomas de grau II apresentaram IH positiva significativamente maior que os de graus I e III ($p = 0,01$). Não houve diferença estatística em relação ao sexo entre os pacientes com IH positiva. **Conclusão:** A presença de DR-D2 sugere a possibilidade de uso de agonistas em terapias complementares. A expressão IH da proteína p53 pode ser útil como elemento de valor prognóstico e na diferenciação do grau tumoral dos meningiomas.

OR05 DIAGNOSTIC DATA AND POST SURGICAL FOLLOW UP IN CUSHING'S DISEASE PATIENTS DUE TO PITUITARY MACROADENOMAS

Machado MC¹, Alcantara AEE¹, Pereira ACL¹, Musolino NRC², Cescato VAS², Bronstein MD¹, Fragoso MCBV¹

¹ Neuroendocrine Unit, Division of Endocrinology and Metabolism. ² Neuroendocrine Unit, Division of Neurosurgery, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, SP, Brazil

Background: Pituitary macroadenomas (≥ 10 mm) represent 10 to 20% of Cushing's disease (CD) patients. Previous studies suggest some different laboratorial data such as lower cortisol suppression after high dose of dexamethasone test, less response to CRH and tendency to lower post surgical remission rate. However, there are few publications about this patient's subgroup. **Objective:** To report laboratorial data, MRI, remission rate and post surgical follow up in group of CD patients due to pituitary macroadenomas. **Material and methods:** Between 1990 and 2011, 233 CD confirmed patients were evaluated, 46 of them (19.7%) with macroadenomas (87% female patients; 33 yrs-old [9-70]). The diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome (ADCS) was established by elevated urinary total cortisol (UTC) levels, no cortisol (F) suppression after low dose dexamethasone test, loss of circadian rhythm of cortisol secretion and elevated or inappropriate ACTH levels. All of them were submitted to sellar MRI and were defined as macroadenomas when highest diameter of lesion was ≥ 10 mm. The diagnosis of CD was confirmed after

pathological analysis showing pituitary adenoma with positive ACTH staining (38/42, 90.5%). Mean follow-up was 62.7 months (4-180). 725 $\mu\text{g}/24\text{h}$. **Results:** At diagnosis, mean UTC of each patient was 822 (reference: 30-300), however, 12% of them presented one or more normal 6.5 mm (10-45), 10 cases $\pm$ samples. In MRI, the maximum diameter was 15.7 with cavernous sinus (CS) invasion and one case (45 mm) with third ventricle and anterior fosse extension. 75% responded to desmopressin test and 78% showed cortisol suppression after overnight 8 mg dexamethasone test ($> 50\%$). As compared to patients with microadenomas, macroadenomas presented higher plasma ACTH levels ($p = 0.01$) and lower serum cortisol/ACTH relation ($p = 0.003$). Overall post-surgical remission rate was 65% (28/43), but higher remission (89%, 16/18) occurred in subgroup of patients with smaller tumors (10-13 mm, 15% with CS invasion) as compared to those with large tumors (14-45 mm, 38% with some invasion): 50% (10/20), $p = 0.01$. Recurrence occurred in 18% of cases (5/28), after 84 months of follow up (15-108). **Conclusion:** Although CD patients with macroadenomas presented higher plasma ACTH levels than microadenomas, they showed lower cortisol/ACTH relation. This patient subgroup is heterogeneous, smaller macroadenomas presenting better post surgical outcome than larger macroadenomas.

OR06 DOPAMINE RECEPTOR 2 EXPRESSION PROFILE IN NON-FUNCTIONING PITUITARY ADENOMAS AND CORRELATION WITH IN VIVO RESPONSE TO CABERGOLINE

Vieira Neto L¹, Wildemberg LE¹, Colli LM², Moraes AB¹, Kasuki L¹, Takiya CM³, Castro MP, Gadelha MR¹

¹ Department of Internal Medicine and Endocrine Unit - Medical School and Clementino Fraga Filho University Hospital - Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). ² Department of Internal Medicine - Medical School of Ribeirão Preto - University of São Paulo. ³ Laboratório de Patologia Celular - UFRJ

Aim: To characterize the dopamine receptor (DR) subtype 2 (DR2 total - DR2T) and its long (DR2L) and short (DR2S) isoforms messenger RNA (mRNA) and the DR2T protein expression in non-functioning pituitary adenomas (NFPA); and to evaluate the effect of adjuvant treatment with cabergoline on tumor volume (TV) and to relate it to the DR mRNA and protein expression. **Methods:** The mRNA was quantified by real time RT-PCR (TaqMan) and protein expression was evaluated by immunohistochemistry. Tumors were classified according to percent of immunostained cells for DR2T in scores 1 ($< 50\%$ of stained cells) or 2 ($\geq 50\%$). Cabergoline was started at least six months after surgery in patients with residual tumor (3 mg/week). The effect of cabergoline was evaluated by magnetic resonance imaging, through tridimensional volume calculation, with acquisition of coronal T1 weighted 1 mm thick images. The margins of the tumor were delineated manually in each 1 mm image in order to calculate tridimensional TV. TV reduction higher than 25% was considered significant. All patients signed the informed consent form. For statistical analysis, Mann-Whitney non-parametric test, chi-square test and Wilcoxon test were used. **Results:** Thirty-seven patients (19 women) were included, with a median age of 56 years-old (30-78). The DR2T, DR2L and DR2S mRNA expression was variable, but observed in 100% of samples ($N = 20$). Similarly, DR2T protein expression was also observed in all tumors ($N = 33$). Five tumors (15%) were classified as score 1 and 28 (85%) as score 2. Median DR2T mRNA expression was higher in the tumors classified as score 2 than in the score 1 ($p = 0.007$), showing concordance between both techniques. Five out of eight (63%) patients showed significant TV reduction with cabergoline therapy. Median TV before and after six months of treatment were 1.73 cm³ (0.61-8.74) and 1.32 cm³ (0.36-4.2) [$p = 0.025$], respectively. TV percent reduction in the whole group was 28%. All patients who presented with a significant TV reduction showed DR2T mRNA expression and their tumors were classified as score 2. **Conclusion:** DR2 is expressed in 100% of NFPA and the fact that cabergoline was efficient in reducing TV in 63% of the patients suggests that it may be used as an adjuvant treatment in patients with residual tumor after surgery.

Endo 2013

March 2013

Miriam da Costa Oliveira,

Dear Dr./Prof. Oliveira

Re: 6410 - Immunohistochemical Expression of D2 Dopamine Receptor and p53 Protein in 170 Meningiomas

We are pleased to inform you that your abstract has been selected by the Annual Meeting Steering Committee for a **poster presentation** at ENDO 2013, June 15-18 in San Francisco, California. Please inform your coauthors that your abstract has been selected for poster presentation. They may view the abstract by searching for their name on the ENDO web program at <https://endo.confex.com/endo/2013endo/webprogram/authora.html>

Instructions for preparing your poster may be found on our web site at

<http://www.endo-society.org/endo2013/presenters.cfm> Posters are assigned **ONE** day for presentation at ENDO.

Session details are as follows:

Date: Saturday, June 15, 2013

Time: **1:45 - 3:45 PM**

Room: Expo Hall, Moscone Center

Poster Board Number: **SAT-336**

Only mount your poster on your assigned day. If you miss your presentation day, you may consult with Endocrine Society staff to determine whether a blank board is available at the Expo. Posters must be removed by 4:00 PM on the day of presentation.

You or your co-authors are required to stay with the poster during the time period listed above; of course, you are welcome to be available at other times on your scheduled presentation day. To give attendees the maximum possible time to view your poster, please mount your poster on your presentation day at the hours specified below. Because the Expo does not open until 10:30, access to the Hall will be controlled; please follow entrance and exit instructions from Security personnel.

Date: Saturday, June 15, 2013

Set up: 7:00 - 9:30 AM

Removal: 4:00 PM

The poster board display area is approximately 3'9" by 7'9" (1.14 x 2.36 meters), allowing for the frame. The top of your poster should include the poster board number, poster title and authors in letters at least 1" (2.5 cm) high. Do not change

the title submitted on your abstract. See Poster Presentation Instructions by visiting <http://www.endo-society.org/endo2013/presenters.cfm>

All poster presenters must attend ENDO 2013 to validate their published abstracts. Winners of travel and other awards will receive a separate notification.

Program information, meeting and housing registration and visa and travel information are all available online at <http://www.endo-society.org/endo2013/>

We look forward to your presentation in San Francisco!

Sincerely,

Diane Robins, PhD

Chair, Annual Meeting Steering Committee

Daniele Marks, MD, PhD

Basic Science Chair, Annual Meeting Steering Committee

R. Michael Tuttle, MD

Clinical Science Chair, Annual Meeting Steering Committee

Immunohistochemical Expression of D2 Dopamine Receptor and p53 Protein in 170 Meningiomas

Miriam da Costa Oliveira, MDPH¹, Julia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima, MD PhD¹, Geraldine Trott, biomedical², Carolina G.S. Leaes, MD PhD³, Marícia Fantinel D'Ávila, PhD⁴ and Nelson Pires Ferreira, MD PhD⁴

¹ Center of Neuroendocrinology / Santa Casa of Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre, Brazil

² Postgraduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil

³ Center of Neuroendocrinology / Santa Casa of Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre, Brazil

⁴ Center of Neuroendocrinology / Santa Casa of Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre, Brazil

Introduction: Meningiomas constitute approximately 20% of all intracranial tumors. They are classified in grades I and II with benign behavior and grade III, malign. Although these tumors are predominantly benign (grades I or II), they have a high recurrence rate. Some studies suggest the role of the D2 dopamine agonists in reducing cell proliferation in meningiomas the presence of D2 receptors in these neoplasms. However, studies are still scarce in the literature. The determination of p53 expression may suggest the proliferative activity of meningiomas and can serve as a predictor of future recurrence. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the expression of dopamine D2 receptor (DR-D2) and p53 protein by immunohistochemistry (IH) in meningiomas. **Material and Methods:** Tumor tissue samples of 170 patients diagnosed with meningiomas were fixed in formalin and embedded in paraffin. The material removed was subjected to the IH technique to determine p53 protein and DR-D2 expression. Tumors were classified into grades I-III according to World Health Organization. Medical records were accessed to collect clinical data. **Results:** Of 170 patients, 77.7% were females and the average age was 53.18±14.59 years. Immunohistochemical expression of DR-D2 was detected in 77% of patients, with no statistically significant difference between tumor grade, sex and age. Regarding the p53 protein immunohistochemical expression it was observed in 41.7% of the samples, with a mean age significantly higher of patients with positive IH (p=0.04). Grade II and III meningiomas presented IH positive for p53 significantly higher than grade I (p=0.01). There was no statistical difference in relation to sex between the patients with IH positive for p53. **Conclusions:** There is IH expression of p53 protein in approximately half of meningiomas and high degree of IH expression of DR-D2. The IH expression of p53 was greater with the increase of age, as well as the anatomopathological graduation, grade II-III showing the highest percentage of positivity. Based on these findings, further studies are needed to expand knowledge in the monitoring of these tumors, as well as possible future implications in its therapeutic.

Nothing to Disclose: MDCO, JFSP, GT, CGSL, MFD, NPF

*Please take note of The Endocrine Society's news embargo policy at www.endo-society.org/endo2013/media.cfm

Table of Contents

This Article

1. Endocr Rev **June 2013**; 34(03_MeetingAbstracts): **SAT-336**

1. Meeting Abstract

- Classifications

1.

○ HORMONE-DEPENDENT TUMORS



SANTA CASA

DE MISERICÓRDIA

VITÓRIA-ES

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF D₂ DOPAMINE RECEPTORS AND p53 PROTEIN IN 170 MENINGIOMAS

SAIT-336

Miriam da Costa Oliveira¹, Julia Fernanda Semmelmann Pereira-Lima¹, Geraldine Trati², Carolina G.S. Leães¹, Marília Fariñeira D'Ávila¹ and Nelson Pires Ferreira¹

¹ Center of Neuroanatomy / Santa Casa of Porto Alegre - UFCSA, Porto Alegre, Brazil, ² Postgraduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, Brazil.

The authors declare no conflict of interest.



INSTITUTO DE

NEUROLOGIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INTRODUCTION

Meningiomas constitute approximately 20% of all intracranial tumors. They are classified in grades I, with benign behavior and grade II and III, malign. Although these tumors are predominantly benign, they have a high recurrence rate. Some studies suggest the role of the D₂ dopamine agonists in reducing cell proliferation in meningiomas, by describing the presence of D₂ receptors in these neoplasms. However, the number of studies are still scarce in the literature. The determination of p53 expression may suggest the proliferative activity of meningiomas and can serve as a predictor of future recurrence.

OBJECTIVE

The aim of this study was to evaluate the expression of dopamine D₂ receptor (DR-D₂) and p53 protein by immunohistochemistry (IH) in meningiomas.

MATERIAL AND METHODS

Tumor tissue samples of 170 patients diagnosed with meningiomas were fixed in formalin and embedded in paraffin. The material removed was subjected to the IH technique to determine p53 protein and DR-D₂ expression. Tumors were classified into grades I-III according to World Health Organization. Medical records were accessed to collect clinical data.

RESULTS

Of 170 patients, 77.7% were females and the average age was 53.18±14.59 years. Immunohistochemical expression of DR-D₂ was detected in 77% of patients, with no statistically significant difference between tumor grade, sex, and age. Regarding the p53 protein immunohistochemical expression it was observed in 41.7% of the samples, with a mean age significantly higher of patients with positive IH (p=0.04). Grade II and III meningiomas presented IH positive for p53 significantly higher than grade I (p=0.01). There was no statistical difference in relation to sex between the patients with IH positive for p53.

A (a) positive control for p53 IH, rat brain tissue (400x); (b) meningioma with positive p53 protein (400x); (c) positive control for DR-D₂, normal human pituitary gland (400x); (d) meningioma with positive DR-D₂ (400x).

e-mail: neuropathology@scsa.edu.br
mcg@mednet.com.br

CONCLUSIONS

There is IH expression of p53 protein in approximately half of meningiomas and high degree of IH expression of DR-D₂. The IH expression of p53 was greater with the increase of age, as well as the anatomicopathological graduation, grade II-III, showing the highest percentage of positivity. Based on these findings, further studies are needed to expand knowledge in the monitoring of these tumors, as well as possible future implications in its therapeutic.

REFERENCES

1. GONÇALVES, L. et al. Growth of cultured human prostate neuroendocrine tumours by neuroendocrine stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112, p. 1068-110, 2015.
2. GONÇALVES, L. et al. CD133+ neuroendocrine stem cells: a novel source of neuroendocrine stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells*, 33, p. 1000-1010, 2015.
3. GONÇALVES, L. et al. Neuroendocrine stem cells: a novel source of neuroendocrine stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells*, 33, p. 1000-1010, 2015.
4. GONÇALVES, L. et al. Neuroendocrine stem cells: a novel source of neuroendocrine stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells*, 33, p. 1000-1010, 2015.
5. GONÇALVES, L. et al. Neuroendocrine stem cells: a novel source of neuroendocrine stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells*, 33, p. 1000-1010, 2015.
6. GONÇALVES, L. et al. Neuroendocrine stem cells: a novel source of neuroendocrine stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells*, 33, p. 1000-1010, 2015.
7. GONÇALVES, L. et al. Neuroendocrine stem cells: a novel source of neuroendocrine stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells*, 33, p. 1000-1010, 2015.
8. GONÇALVES, L. et al. Neuroendocrine stem cells: a novel source of neuroendocrine stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells*, 33, p. 1000-1010, 2015.
9. GONÇALVES, L. et al. Neuroendocrine stem cells: a novel source of neuroendocrine stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells*, 33, p. 1000-1010, 2015.
10. GONÇALVES, L. et al. Neuroendocrine stem cells: a novel source of neuroendocrine stem cells for regenerative medicine. *Stem Cells*, 33, p. 1000-1010, 2015.

5.3. Protocolo de Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada a partir de espécimes cirúrgicos incluídos em parafina e seccionados em micrótomo com 4µm de espessura. As secções foram desparafinizadas em 2 banhos de xilol, reidratadas com etanol e, após, incubadas para recuperação antigênica em soluções de citrato de sódio (pH=6) e de TRIS-EDTA para, respectivamente, p53 e DR-D₂ por 40 minutos, em banho-maria à temperatura de 97°C. Após o resfriamento, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, no qual as amostras foram incubadas em H₂O₂ 5% diluído em metanol (3x 10min). Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução tampão de fosfato (PBS) e, imediatamente, para o bloqueio das proteínas inespecíficas, incubadas com albumina de soro bovino (BSA 1%) diluído em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se com a incubação do anticorpo monoclonal anti-p53 (clone DO-7, DAKOCytomation®, USA, M7001, concentração 1:100) e do anticorpo policlonal anti-DR-D₂ (Chemicon® - USA, AB5084P, concentração 1:150) onde as lâminas foram deixadas overnight a 4°C. No dia seguinte, o material foi lavado em PBS e depois incubado com o anticorpo secundário (kit LSAB DakoCytomation®), seguido do anticorpo terciário (ambos a temperatura ambiente por 30 min. cada). O complexo antígeno/anticorpo foi revelado com o substrato cromogênico DAB (diamino-benzidina) (5 min) e as secções contracoradas com hematoxilina de Harris. Para controles positivos foram utilizados hipófises humanas não patológicas e fragmentos de glândula mamária (para DR-D₂ e p53, respectivamente). Como controle negativo da técnica, o anticorpo primário foi substituído por soro fisiológico.