



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina



Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
“Manuel Velasco Suárez”

**“Expresión de Receptores de Dopamina en Meningiomas
como probable Blanco Terapéutico de Respuesta
Antiproliferativa a Agonistas de Dopamina”**

TESIS

Que presenta:

JORGE MANUEL NAVARRO BONNET

Para obtener el grado de Especialista en:

NEUROCIRUGÍA

Tutor:

Dra. Lesly Portocarrero Ortiz



Ciudad de México, Julio 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Coautores:**Dra. Alma Ortiz Plata**

Investigador en Ciencias Médicas
Laboratorio de Neuropatología Experimental
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
“Manuel Velasco Suárez”

Dr. Juan Pablo González Mosqueda

Residente de la especialidad en Neurocirugía
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
“Manuel Velasco Suárez”



UNAM-Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Pablo León Ortiz

Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"

Dr. Juan Luis Gómez Amador

Subdirector de Neurocirugía
Profesor Titular del Curso de Especialidad en Neurocirugía
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"

Dra. Lesly Portocarrero Ortiz

Tutor de Tesis
Médico Adscrito al Servicio de Neuroendocrinología
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"

AGRADECIMIENTOS

A mis padres...

Por sus perfectas enseñanzas, por todo el sacrificio que han hecho para que yo logre mis objetivos, por ser mi ejemplo y los pilares que sostienen mi vida.

A Alexis...

Por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, por ser mi mejor amiga, mi colega más fiel, mi profesora más comprometida y mi alumna más aplicada, por ser mi compañera de vida, simplemente por siempre estar ahí, por ser el amor de mi vida.

A mis maestros...

A todos y cada uno de los que han contribuido a mi formación, por compartirme su sabiduría y enseñarme este hermoso arte, por ser las personas más altruistas que existen, brindando todos sus conocimientos a cambio de nada, únicamente de la satisfacción de que tu llegues a la meta.

CONTENIDO

	Página
1. Resumen	7
2. Antecedentes	9
3. Planteamiento del problema	14
4. Hipótesis	15
5. Objetivos	16
6. Justificación	17
7. Material y métodos	25
8. Resultados	30
9. Discusión	42
10. Conclusión	46
11. Referencias	47

RESUMEN

Introducción: Los meningiomas (MNG's) son el tumor intracraneal primario más común en adultos. Si bien la resección quirúrgica ofrece excelentes resultados, en la actualidad no existe una alternativa terapéutica efectiva para pacientes con MNG's no resecables quirúrgicamente.

Justificación: Existe un importante subgrupo de pacientes con MNG's no resecables quirúrgicamente, refractarios a terapias convencionales, invasores, recurrentes, atípicos o anaplásicos. Estos pacientes requieren tratamientos alternativos y pese a los avances tecnológicos, sus opciones son muy limitadas o nulas. Por lo que resulta imperativo estudiar nuevos tratamientos que ofrezcan una posibilidad de curación. Mediante la estimulación de receptores de dopamina (RD), los agonistas dopaminérgicos (AD) han demostrado tener un efecto antiproliferativo en múltiples neoplasias. Los MNG's expresan RD en sus membranas celulares, no obstante, los resultados respecto al tipo de RD varían de acuerdo a la técnica de detección utilizada.

Objetivo: Detectar mediante inmunohistoquímica la expresión de Ki-67, RD-D1 y RD-D2 en tejido de MNG's humanos, y analizar su correlación con sexo, localización y niveles de hormona luteinizante, folículo estimulante y prolactina.

Material y métodos: Mediante inmunohistoquímica se identificó la expresión de Ki-67, RD-D1 y RD-D2 en tejido de MNG's incluidos en bloques de parafina de tumores resecados en el Departamento de Neurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNyN "MVS")

Resultados: Se analizaron 23 MNG's, 10 mujeres (43.48%), la edad promedio fue 44.5 años, con índice de masa corporal (IMC) promedio 28.42. La variante histopatológica más común fue grado I o típica (70%). El índice de expresión promedio de Ki-67 fue: 18.9, RD-D1 23.02 y RD-D2 8.33. No hubo relación significativa entre los diferentes marcadores celulares, ni entre la expresión del RD y la localización el subtipo histológico del MNG. Sin embargo, el índice de expresión de Ki-67 tuvo relación significativa con la edad promedio ($p= 0.03$) y con los niveles de prolactina ($p= 0.02$).

Conclusiones: Los MNG's expresan RD-D2 que se pueden detectar mediante inmunohistoquímica. Estos hallazgos son novedosos y promisorios, ya que la estimulación del RD-D2 desencadena una reacción intracelular inhibidora y los AD con los que se tiene experiencia en el tratamiento de otras neoplasias actúan sobre este RD. Estudios posteriores ayudaran a esclarecer el efecto real que se puede obtener con la estimulación de estos RD.

ANTECEDENTES

Los meningiomas (MNG's) son el tumor intracraneal primario más común en adultos y representan el 35% de todas las neoplasias cerebrales primarias.¹⁻³ Más del 90% son lesiones histológicamente benignas (TABLA 1), de lento crecimiento y susceptibles de ser resecadas en su totalidad. Sin embargo, existe un pequeño pero importante subgrupo de pacientes con MNG's no resecables quirúrgicamente, refractarios a las terapias convencionales, invasores o de comportamiento recurrente, atípico o anaplásico. Estos MNG's requieren de tratamientos alternativos y pese a los avances tecnológicos, las opciones son muy limitadas o nulas.⁴⁻⁶

Tabla 1. Porcentaje de meningiomas benignos (grado I) de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), atípicos (grado II) y anaplásicos (grado III), y tasa de recurrencia.⁴⁻⁶

	Porcentaje	Tasa de recurrencia
Benignos (OMS grado I)	>90%	7-20%
Atípicos (OMS grado II)	4.7 a 7.2%	40% a pesar de resección
Anaplásicos (OMS grado III)	1 a 2.8%	50-80% usualmente mueren dentro de los 2 años del diagnóstico

Es importante resaltar que si bien una resección Simpson I cura >90% de los pacientes, una resección parcial o toma de biopsia condena a los pacientes a la recurrencia si se siguen a 15 años, y una vez que esta ocurre 60% mueren por causas asociadas al tumor durante los siguientes 10 años (TABLA 2).⁷⁻¹⁰

Tabla 2. Escala de Simpson para resección de meningiomas y riesgo de recurrencia o progresión.⁷⁻⁹

Grado	Resección	Tasas de recurrencia o progresión		
		Simpson ⁷	Miraminoff ⁸	Adegbite ⁹
I	Macroscópicamente total con implante dural y hueso anormal; incluidos los senos si están comprometidos	9%	32%	14%
II	Macroscópicamente total con coagulación del implante dural	16%	-	18%
III	Macroscópicamente total sin resección ni coagulación del implante dural o extensión extradural	29%	-	100% <i>n</i> = 3
IV	Resección parcial	39%	91%	48%
V	Descompresión con o sin biopsia	100%	-	-

⁷No reportan mediana de supervivencia.

⁸Resultados de 225 pacientes a 15 años de supervivencia libre de progresión.

⁹Resultados de 114 pacientes a 5 años de supervivencia libre de progresión.

La radioterapia, que se pensó sería una opción efectiva para estos pacientes, ha fallado en su objetivo de control de MNG's residuales a largo plazo. A pesar de recibir radioterapia, hasta un 75% de los pacientes tienen recurrencia y un 56% presentan complicaciones neurológicas relacionadas a esta. En reportes de estudios a largo plazo, no solo aumenta la preocupación de falla a esta modalidad de tratamiento, sino también de un comportamiento tumoral más agresivo después de recibir radiocirugía.^{11,12} La tasa de supervivencia a 15 años posterior a *gamma knife* es del 53%, y un 68% mueren por causas asociadas al tumor.³³ En palabras de

Ossama Al-Mefty en su libro “Al-Mefty’s Meningiomas”: “estamos viendo un aumento en el número de pacientes tratados alrededor del mundo con resecciones subtotales, quienes se encuentran desesperados porque que se han sometido a múltiples cirugías y radiocirugía, solo para que el tumor crezca más rápido y se transforme en un grado patológico mayor, que tiene como resultado un largo camino de morbilidad acumulada, agonía y gastos en manejo paliativo, mientras la posibilidad de curación se pierde”.¹³

Pese a la experiencia que existe con agentes que actúan sobre objetivos moleculares para el tratamiento de algunas neoplasias cerebrales malignas, esta y otras estrategias, como las terapias hormonales, desafortunadamente han sido ineficaces contra los MNG’s. Los resultados utilizando terapia blanco han sido modestos en el mejor de los casos y a menudo asociados con toxicidad significativa.¹⁵ Probablemente ha sido debido al pobre entendimiento de los cambios moleculares críticos que llevan al crecimiento tumoral, la falta de líneas celulares y de modelos tumorales para realizar estudios preclínicos, que el progreso para identificar terapias alternativas ha sido limitado. Sin embargo, esto nos permite continuar en la búsqueda de algún tratamiento novedoso que complemente el abordaje tradicional y nos guíe a un manejo más efectivo.¹⁴

The National Comprehensive Cancer Network (NCCN) reconoció en sus guías de 2011 la existencia de únicamente 3 medicamentos (hidroxiurea, interferón- α 2B y somatostatina de liberación prolongada) para el tratamiento de los MNG’s inoperables o refractarios a radioterapia, no obstante, basados en pocos estudios con sus respectivas limitaciones:¹⁶

- Evidencia convincente muy limitada para determinar una terapia apropiada.
- Escasez de estudios en pacientes con MNG's recurrentes.
- Falta de estandarización de que constituye una respuesta significativa a la terapia, que reconozca que estas mediciones difieren entre MNG's de bajo y alto grado.

La hidroxiurea demostró en los primeros estudios de pequeña escala cierta eficacia. Sin embargo, la interpretación de los resultados era cuestionable, ya que eran pacientes en quienes la radioterapia no había fallado o se estaba administrando concomitantemente.³⁴⁻³⁷ En estudios más recientes no ha demostrado eficacia clínica significativa. En un ensayo a gran escala, el 65% de los pacientes presentó progresión de la enfermedad.³⁸ Otro estudio retrospectivo en pacientes con MNG's grado II y III de acuerdo a la OMS, el 57% presentaron progresión a 6 meses.³⁹ Por lo que, aunque generalmente es bien tolerada con baja toxicidad, parece tener actividad muy limitada en el control de estos tumores.

En cuanto a la somatostatina de acción prolongada, el ensayo más grande en MNG's, arrojó resultados divididos. De 16 pacientes tratados, una tercera parte tuvo respuesta parcial, otra tercera parte estabilidad, y el otro tercio mostró progresión clínica.⁴⁰ El Pasireotide, un análogo de la somatostatina de acción prolongada, ha demostrado estabilidad de la enfermedad, no obstante, sin respuesta radiológica.⁴¹

El estudio más extenso con interferón- α 2B incluyó 35 pacientes, de los cuales ninguno tuvo respuesta parcial ni completa. Pese a que no se presentó

toxicidad significativa, el 74% se mantuvo estable únicamente durante 12 semanas y la mediana de supervivencia fue de 8 meses. La mediana de supervivencia tan baja puede ser debido a que se seleccionó un grupo de pacientes con mal pronóstico, por lo que no prueba su eficacia en meningiomas refractarios.⁴²

Por todo esto resulta evidente que aún existe una necesidad insatisfecha en el campo de la neuro-oncología, para definir el rol del tratamiento médico de los MNG's y una oportunidad para continuar en la búsqueda de la cura para estos pacientes.¹⁷

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los MNG's son el tumor intracraneal primario más común en adultos.¹⁻³ Si bien la resección quirúrgica ofrece excelentes resultados, existe un pequeño pero importante subgrupo de pacientes con MNG's no resecables quirúrgicamente, refractarios a las terapias convencionales, que invaden estructuras neurovasculares o que muestran un comportamiento recurrente, atípico o anaplásico. Estos MNG's requieren de tratamientos alternativos y pese a los notables avances tecnológicos, actualmente no existe una alternativa terapéutica que sea efectiva.⁴⁻⁶

Parece concebible que el crecimiento de estos tumores se encuentra bajo control dopaminérgico y los AD pueden tener un rol potencial en el tratamiento médico de pacientes con MNG's recurrentes o irresecables, quienes se podrían beneficiar de esta opción terapéutica.^{27,29} No obstante, existe discrepancia en cuanto a la expresión del RD que expresan las células de MNG's, los resultados han sido ambiguos y varían dependiendo de la técnica de detección.^{30,31} Ha sido hasta fecha reciente que mediante inmunohistoquímica se ha encontrado el RD-D2, que es el que desencadena una respuesta intracelular inhibitoria,²³ y en el que actúan los principales AD de importancia clínica.³²

Por lo tanto, caracterizar adecuadamente el tipo de RD que expresan los MNG's es el primer paso para poder considerarlos un blanco terapéutico y a los AD una alternativa factible para el tratamiento de estos tumores.

HIPÓTESIS

Las células de MNG's de muestras tumorales de pacientes operados en el Departamento de Neurocirugía del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (INNyN"MVS") expresan RD-D2 detectados mediante inmunohistoquímica.

Relevancia de la hipótesis:

En caso de demostrar que las células de MNG's de muestras tumorales de pacientes operados en el INNyN"MVS" expresan RD-D2 detectados mediante inmunohistoquímica, se abre la puerta para que en posteriores estudios pueda evaluarse el efecto antiproliferativo que por serendipia han demostrado tener los AD y que sea útil como una nueva opción terapéutica para nuestros pacientes afectados por MNG's. Estos medicamentos han sido ampliamente utilizados en múltiples patologías, demostrando un perfil farmacológico seguro con pocos efectos adversos. Además, son económicamente accesibles para gran parte de la población, no solo en México, si no en la mayoría de los países en vías de desarrollo, por lo que sería una alternativa altamente factible.

OBJETIVOS

Primario:

Analizar la expresión mediante inmunohistoquímica de los receptores de dopamina D1, D2 y del marcador de proliferación celular Ki-67 en células de MNG's de muestras tumorales de pacientes adultos, de cualquier sexo operados en el Departamento de Neurocirugía del INNyN"MV".

Específicos:

Clasificar los MNG's por tipo celular y grado de malignidad de acuerdo a la OMS 2007.

Analizar si la expresión mediante inmunohistoquímica del marcador de proliferación celular Ki-67, y de los receptores de dopamina D1 y D2 en células de MNG's, tiene alguna relación con el subtipo histopatológico, grado de malignidad o localización.

JUSTIFICACIÓN:

En 2013, una revisión de estudios publicados durante las últimas 2 décadas relacionados al manejo médico de los MNG's (investigaciones *in vitro*, en animales y en humanos), con énfasis a mecanismos de acción, eficacia clínica y efectos adversos, mostró agentes moleculares, citotóxicos, hormonales, inhibidores de angiogénesis, inmunomoduladores y terapias combinadas (TABLA 3). En este trabajo concluyen que el entendimiento de la biología celular de los MNG's ha progresado significativamente, facilitando el desarrollo de terapias promisorias. Sin embargo, se requieren más investigaciones para determinar la eficacia y perfil de eventos adversos de estos agentes, así como seguir analizando otras opciones de tratamiento. El descifrar la compleja vía de señalización (FIGURA 1), ayudará a conferir terapias más precisas.¹⁸

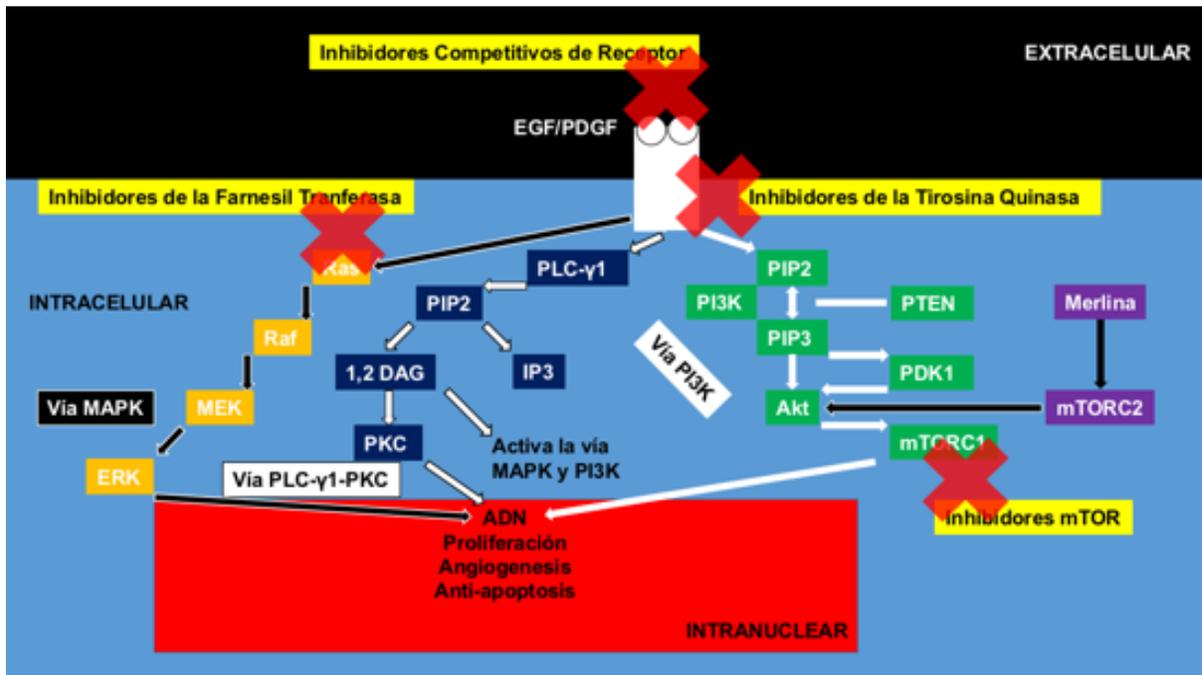
Tabla 3. Agentes para el manejo medico de los MNG's, su mecanismo de acción y la fase de estudio en la que se encuentran.¹⁸

MEDICAMENTO	MECANISMO DE ACCIÓN	ETAPA DE LA INVESTIGACIÓN
Citotóxicos		
Temozolamida	Agente alquilante	Fase II: sin eficacia clínica
Irinotecan	Inhibidor de topoisomerasa 1	Fase II: sin eficacia clínica
Hidroxiurea	Inhibidor de la ribonucleotido reductasa	Fase II: resultados mixtos
Trabectedin	Mecanismo poco claro	Preclínico: in vitro
Derivados de plantas		
Curcumin	Interacción con proteínas de señalización	Preclínico: in vitro
AKBA	Inducción de apoptosis	Preclínico: in vitro
Hormonales		
Megestrol	Agonista parcial del receptor de progesterona	Clínico a baja escala: sin beneficio
Mifepristona	Antagonista competitivo del receptor de progesterona	Fase III: sin beneficio
Tamoxifeno	Antagonista competitivo del receptor de estrógeno	Clínico a baja escala: sin beneficio
Octreotide	Mimético de la somatostatina	Fase II: cierta estabilización
Pasireotide	Mimético de la somatostatina	Fase 2: en marcha
Pegvisomant	Antagonista del receptor de GH	Preclínico: modelos animales
Fenretinide	Antagonista IGF-I & II	Preclínico: in vitro
Moleculares		

Imatinib	Antagonista del PDGFR	Fase II: cierta estabilización
Gefitinib	Antagonista del EGFR	Fase II: sin beneficio
Erlotinib	Antagonista del EGFR	Fase II: sin beneficio
Bevacizumab	Ac's monoclonales para VEGFR	Clínico a baja escala: resultados mixtos
Sunitinib/Vatalanib	Antagonista dual (VEGFR&PDGFR)	Fase II: cierta estabilización
Inmunomoduladores		
IFN α 2B	Antiproliferativo & antiangiogenico	Fase II: resultados mixtos
Inhibidor TL4	Impide la fuga de mecanismos de vigilancia inmune	Preclínico: in vitro
Posibles adyuvantes		
Bloqueadores de canales de Ca		Preclínico: modelos animales
Estatinas	Inhibición de la vía MAPK	Preclínico: in vitro
Antiretrovirales		Preclínico: in vitro

EGFR= Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico; PDGFR= Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas; VEGFR= Factor del Receptor de Crecimiento Endotelial Vascular.

Figura 1. Esquema de las vías de señalización celular involucradas en la patogénesis de los meningiomas.^{14,18}



MAPK= Proteína Quinasa Activada por Mitógeno; ERK= Quinasa Regulada por señal Extracelular; IP3= Inositol 1,4,5-trifosfato; PIP2= Fosfatidilinositol (4,5)-Bisfosfato; PIP3= Fosfatidilinositol (3,4,5)-Trisfosfato; PDK1= Quinasa Dependiente de Fosfoinositida-1; PTEN= Homólogo de Fosfatasa y Tensina; 1,2-DAG= 1,2-Diacilglicerol.

La dopamina, a través de la activación de sus 5 receptores (subtipos D1 a D5) pertenecientes a la familia de receptores transmembrana acoplados a proteína G, ha demostrado inhibir el crecimiento celular en múltiples neoplasias.¹⁹⁻²² Se ha analizado la expresión de estos receptores y su efecto en células de MNG's.

Schrell y cols. mediante análisis de Scatchard encontraron que el RD-D1 se expresa y regula independientemente del RD-D2 (que se encuentra ausente) en MNG's cerebrales humanos.³⁰ Además, reportan una disminución significativa en la tasa de proliferación de células de MNG en cultivos, tras la aplicación directa de

dopamina, apomorfina (acción D1 y D2) y de SKF-38393 (AD que actúa sobre el RD-D1).²⁹

Carroll y cols. sugieren firmemente la presencia de RD-D1 activos en MNG's cerebrales humanos, basados en la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), la presencia de la proteína-receptor y de la unión al ligando, que detectaron utilizando análisis de Scatchard, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RCP-TR) y secuenciación directa de RCP. En contraste, a pesar de que encontraron RD-D2 mediante ARNm, RCP-TR y secuenciación directa en tejido natural y de cultivo, el análisis de Scatchard no detectó la unión al ligando del RD-D2 (TABLA 4).³¹ Para explicar estos hallazgos hicieron algunas hipótesis:

- El ARNm del RD-D2 no se traduce.
- El ARNm se traduce de manera defectuosa y la proteína esta mutada, por lo que no puede unirse a ligandos selectivos de D2.
- El empalme del ARNm es incorrecto.
- La RCP-TR detecta niveles muy bajos de ARNm donde el análisis de Scatchard es menos sensible.

Tabla 4. Detección de receptores de dopamina D1 y D2 mediante análisis de Scatchard, northern blot y southern blot.³¹

Receptor de Dopamina	D1	D2
n	n=25: 16 mujeres y 9 hombres	n= 26 17 mujeres y 9 hombres
Análisis de Scatchard	Puede no ser sensible en niveles bajos del receptor [2 (-) en MNG's que fueron (+) por PCR]	No detectó ninguno. El tejido control (cerebro humano y de rata) demostró que el sistema que utilizaron estaba libre de errores.
Northern blot	No detectable	"Algunas muestras"
Southern blot	69% de las mujeres 100% de los hombres	100% de los especímenes
Comentarios	Sin relación entre la presencia de ARNm para D1 y edad o histopatología del MNG	

Estos resultados brindaban evidencia de que los MNG's cerebrales humanos poseen RD-D1 específicos y de alta afinidad. En ese momento (90's) consideraron que se requerían más estudios para determinar el mecanismo de acción y que los pacientes con MNG's se podían beneficiar de los AD (especialmente selectivos del RD-D1).²⁹⁻³¹

No obstante, al analizar la estructura y función de los RD se sugiere la existencia de 2 grupos (TABLA 5).²³

Tabla 5. Grupos y subtipos de receptores de dopamina, y su función.²³

Nombre	Receptores	Función
como-D1	D1 D5	Su activación estimula la enzima adenilato ciclasa y aumenta la concentración de adenosín monofosfato-3',5'cíclico (AMPc): <i>ESTIMULACIÓN</i>
como-D2	D2 D3 D4	Su activación inhibe la enzima adenilato ciclasa y disminuye los niveles de AMPc intracelular= <i>INHIBICIÓN</i>

Los AD a través de la activación de las isoformas del RD-D2, corto (D_{2C}) y largo (D_{2L}), inducen vías (especialmente la de la MAPK) y/o ERK) involucradas en la regulación del metabolismo, crecimiento, diferenciación celular y apoptosis, provocando un efecto antiproliferativo sobre las células de MNG's (ver figura 1).²⁴⁻

²⁶ Basados en esto, había que buscar los RD-D2, que son los que desencadenan un efecto inhibitor. Además, la mayoría de los AD con los que se ha demostrado este efecto antiproliferativo actúan sobre este receptor.

Las concentraciones micromolares de bromocriptina (potente agonista D2, con actividad antagónica sobre el D1), a diferencia de otras hormonas (estrógenos, progesterona, acetato de ciproterona y el antagonista primario de andrógeno 11-alfa), disminuyen significativamente, de manera consistente y potencial la tasa de proliferación en MNG's *in vitro* (inhibición 25-56%, dosis-dependiente).²⁸ De igual manera, existe información que sugiere que la cabergolina (potente agonista del receptor D2 con poca afinidad por el D1) también tiene este efecto antiproliferativo

en MNG's *in-vivo*. Un paciente con un MNG recurrente, hiperprolactinemia con amenorrea y galactorrea, respondió al tratamiento con cabergolina y resultó en ausencia de progresión de la neoplasia, sin síntomas por compresión ni crecimiento de la misma 11 años después del tratamiento.²⁷ Por lo que es concebible que el crecimiento de estos tumores puede estar bajo control dopaminérgico y los AD tener un rol potencial en el tratamiento médico que pueda beneficiar a pacientes con MNG's recurrentes o irresecables.^{27,29}

METODOLOGÍA

Diseño del estudio: retrospectivo, observacional, transversal, analítico.

Población objetivo: muestras de tejido de MNG incluidos en bloques de parafina, de pacientes adultos, de cualquier sexo, operados en el INNyN" MVS" durante el periodo de 2010 a 2015 y que cumplan con los siguientes criterios:

INCLUSIÓN

Pacientes adultos (>18 años).
 Resección quirúrgica en el Departamento de Neurocirugía del INNyN" MVS".
 Diagnóstico histopatológico de MNG por el Departamento de Neuropatología del INNyN sin importar subtipo histológico.
 Cualquier sexo.
 Tejido en bloque de parafina para realizar inmunohistoquímica.

EXCLUSIÓN

Que no se cuente con bloque de parafina con tejido de MNG para realizar la inmunohistoquímica.

ELIMINACIÓN

Muestra insuficiente de tejido para realizar las tinciones.
 Diagnostico histopatológico diferente a MNG.

Tamaño de la muestra: A conveniencia.

Consideraciones éticas: Este protocolo se diseñó con base a las especificaciones y principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, aceptados por la 18ª asamblea mundial de Helsinki y la 64ª asamblea llevada a cabo en la

ciudad de Fortaleza, Brasil en 2014. Además, fue sometido a revisión y aprobado por el Comité de Investigación del INNyN“MVS” con número 20/16.

Consideraciones financieras: el aporte económico lo brindo la clínica de neuroendocrinología del INNyN“MVS”.

MATERIAL Y METODOS:

El estudio de muestras incluyó tejido tumoral de 23 MNG´s, obtenidos mediante cirugía en el Departamento de Neurocirugía y con diagnóstico histológico realizado por el Departamento de Neuropatología del INNyN“MVS” durante el periodo de 2010 a 2015. Se clasificaron de acuerdo a los criterios para subtipo histológico y grado tumoral de la OMS en grado I, II y III (TABLA 6). Este estudio fue aprobado por el comité de investigación del INNyN“MVS” con número 20/16 y realizado de acuerdo a las especificaciones de la declaración de Fortaleza, Brasil 2014.

Tabla 6. Clasificación para Meningiomas de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud 2007.

OMS Grado I	Meningotelial
	Fibroblástico
	Transicional
	Psamomatoso
	Angiomatoso
	Microquístico
	Secretor
	Linfoplasmocítico
	Metaplásico
OMS Grado II	Cordoide
	Células claras
	Atípico
OMS Grado III	Papilar
	Rabdoide
	Anaplásico

Inmunohistoquímica:

Del tejido de meningioma incluido en parafina, se elaboraron cortes de 4mm de grosor que fueron montamos en laminillas con poli-L-lisina. Los cortes fueron desparafinados en xilol e hidratados en soluciones de alcohol de concentraciones graduales descendentes (absoluto, 96%, 80% y 70%), en baños de 3 minutos cada uno, hasta agua destilada. Se realizó recuperación antigénica en una olla de presión por 6 minutos, colocando las laminillas en un vaso Koplín con la solución recuperadora Diva Decloaker (Biocare Medical, LLC. Concord, CA. USA). Posteriormente las laminillas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se

bloqueó la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 0.3% en agua destilada por 15 minutos, se lavaron las laminillas con agua destilada; se enjuagaron en PBS por 3 minutos y se realizaron 2 lavados de 3 minutos en PBS-tritón al 0.1% (Triton X-100 Sigma Aldrich, St.Louis). Se incubaron en los siguientes anticuerpos primarios: anti-Ki-67 clona MIB-1 (Dilución 1:100; Dako Denmark, número de catálogo M7240) por 1 hora; anti-receptor de dopamina D1 (Dilución 1:500; abcam Cambridge England número de catálogo ab-20066) toda la noche a 4°C; estas laminillas fueron previamente incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente en albúmina bovina al 20% con el fin de bloquear los sitios antigénicos inespecíficos; anti-receptor de dopamina D2 (Dilución 1:150; Chemicon USA) toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (Super Sensitive MultiLink, BioGenex CA. USA) por 30 minutos y se realizaron 3 enjuagues con PBS-Triton X-100 0.1% de 3 minutos cada uno. Se incubaron con el marcador Streptavidin Peroxidase (SS Label, BioGenex CA USA) por 30 minutos. Las incubaciones se realizaron en un equipo IQ Kinetic Slide Stainer (Biocare Medical, Concord CA). La reacción se reveló con diaminobencidina con el kit 2-Compotent DAB Pack (BioGenex, CA, USA) por 5 minutos y se enjuagó con agua destilada durante 5 minutos. Se realizó contra-tinción con hematoxilina durante 2 minutos, se enjuagó en agua corriente y se viró la tinción en una solución de carbonato de litio al 0.5% por 10 segundos. Para finalizar, las laminillas fueron deshidratadas en alcohol al 70%, 80%, 96% y absoluto, OH-xilol y xilol y montadas con cubreobjetos en una resina (Entellan Merck Darmstadt, Germany). Las biopsias fueron observadas al microscopio de luz (Olympus BH2). El análisis de la expresión de los diferentes marcadores (Ki-67, RD-D1 y RD-D2) se realizó con microscopio Nikon Eclipse E200

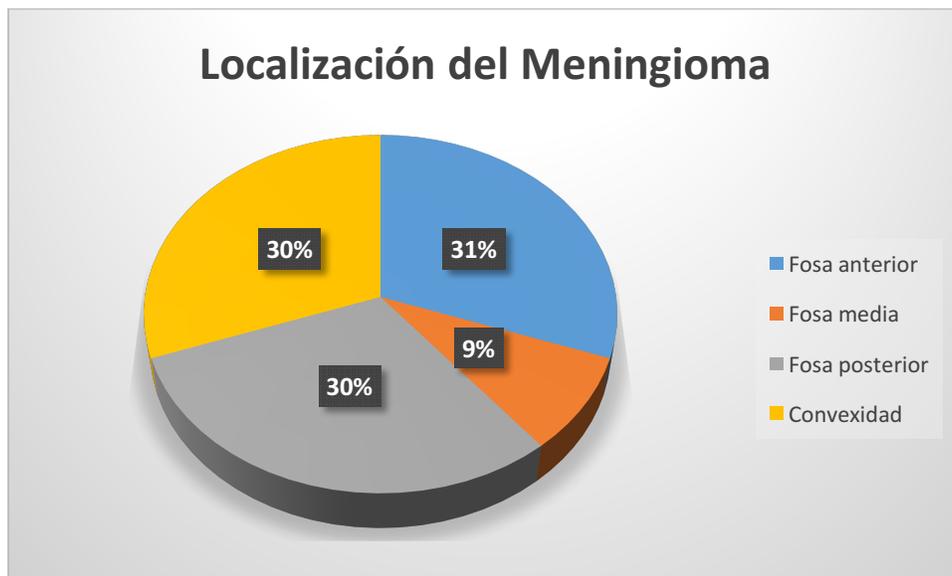
(Tokyo, Japan) a un aumento de 40x, adquiriendo imágenes con el programa lagine Q-Capture-Pro 7 (2010), 10 campos por muestra. Se realizó análisis cuantitativo de la expresión mediante el programa ImageJ® 1.49V (Wayne Raasband, National Institute of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>). Se realizó análisis estadístico (paquete STATA versión 11) de varianza (ANOVA) y prueba de T con una $p < 0.05$ con el fin de averiguar si existen diferencias en la expresión de Ki-67, RD-D1 y RD-D2 entre los diferentes casos, de acuerdo a la localización del MNG y el subtipo histológico.

RESULTADOS:

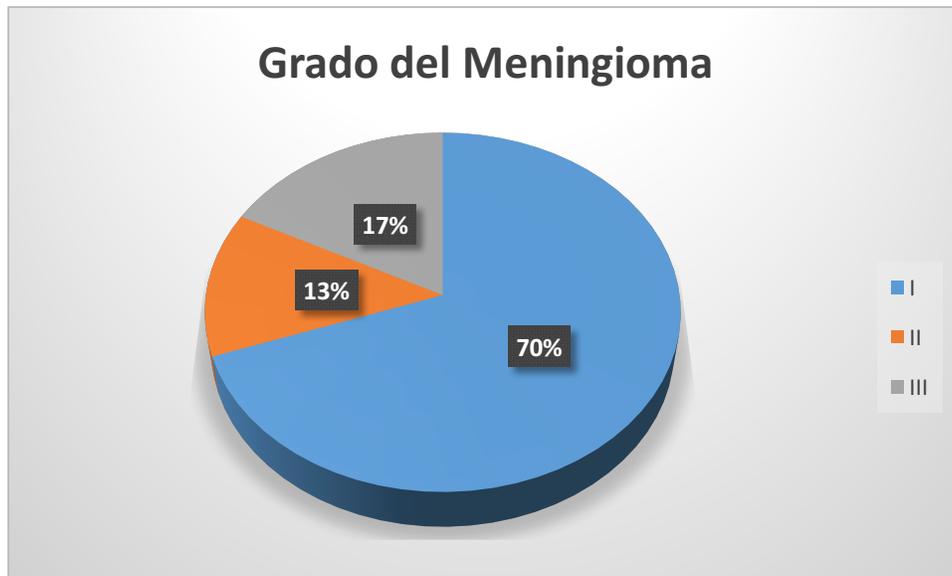
De los 23 pacientes, 10 eran mujeres (43.48%), con edad promedio 44.52 años (Rango: 26-71 años), el Índice de Masa Corporal (IMC) promedio fue 28.42Kg/m² (rango: 19.5-39.8Kg/m²). Catorce pacientes (7 mujeres y 7 hombres) tenían niveles séricos de prolactina (media: 27.67 mUI/ml), hormona luteinizante (6.29 mUI/ml) y hormona folículo estimulante (11.2mUI/ml). De acuerdo a su localización los dividimos en 4 grupos: convexidad (10%), piso anterior (30%), piso medio (20%) y fosa posterior (40%) (GRAFICA 1). La variante histopatológica más común de acuerdo a la clasificación de la OMS de 2007 fue la típica (70%), seguida de los MNG's atípicos (13%) y anaplásicos (17%) (GRAFICA 2). Un 90% (20 pacientes: 10 hombres y 10 mujeres) tuvieron recidiva o residual tumoral. El índice de expresión de Ki-67 promedio fue de 18.9 (Rango: 7.0-50.8); más alto en hombres que en mujeres (21.63 vs 15.34). El índice de expresión de RD-D1 promedio fue de 23.02 (Rango: 2.9-65.0) más alta en hombres (27.01) que en mujeres (17.83). El índice de expresión del RD-D2 promedio fue de 8.33 (Rango: 0.1-45.8), de igual manera más alto en hombres (9.35) que en mujeres (7.0). Se realizó análisis estadístico (paquete STATA versión 11) para valorar si la expresión de Ki-67, RD-D1 y RD-D2 guardaba relación significativa con alguna de las variables o entre los mismos marcadores. El sexo [Ki-67 (p= 0.828), RD-D1 (p= 0.321) y RD-D2 (p= 0.494)], la localización del meningioma [Ki-67 (p= 0.362), RD-D1 (p= 0.268) y RD-D2 (p= 0.670)], el grado histológico de acuerdo a la clasificación de la OMS del 2007 [Ki-67 (p= 0.658), RD-D1 (p= 0.762) y RD-D2 (p= 0.873)], niveles de FSH [Ki-67 (p= 0.572), RD-D1 (p= 0.713) y RD-D2 (p= 0.825)], niveles de LH [Ki-67 (p= 0.421), RD-D1 (p= 0.799) y RD-D2 (p= 0.701)], niveles de PRL [Ki-67 (**p= 0.024**), RD-D1 (p=

0.145) y RD-D2 ($p= 0.833$), IMC [Ki-67 ($p= 0.290$), RD-D1 ($p= 0.110$) y RD-D2 ($p= 0.638$)]. No hubo relación significativa entre los marcadores celulares: Ki-67 no tuvo relación significativa con RD-D1 ($p=0.955$) ni RD-D2 ($p= 0.416$); tampoco entre el RD-D1 y RD-D2 ($p= 0.539$). Las únicas 2 variables que tuvieron relación significativa fue edad con Ki-67 ($p= \mathbf{0.03}$) y niveles de prolactina con Ki-67 ($p= \mathbf{0.02}$). El resto de las variables sexo

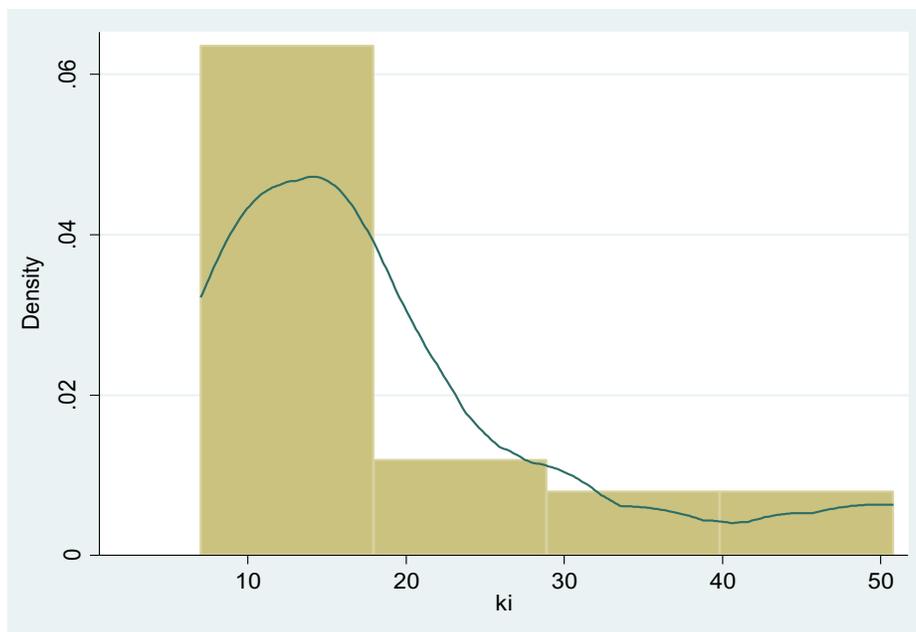
Grafica 1. Se muestran los porcentajes de la localización de MNG's analizados en esta serie.



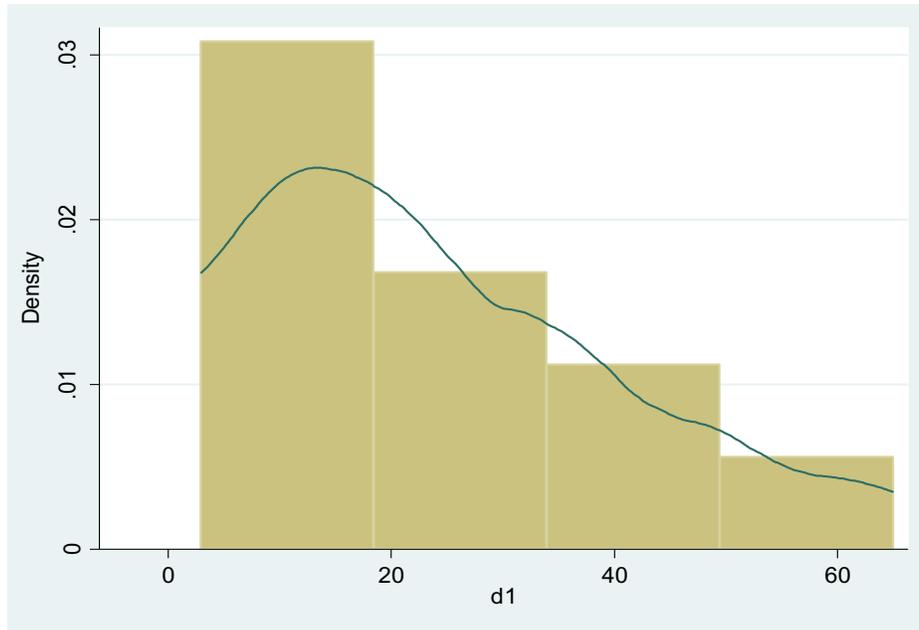
Grafica 2. Se muestran los grados histológicos de acuerdo a la clasificación de la OMS de 2007 de los MNG's analizados en esta serie.



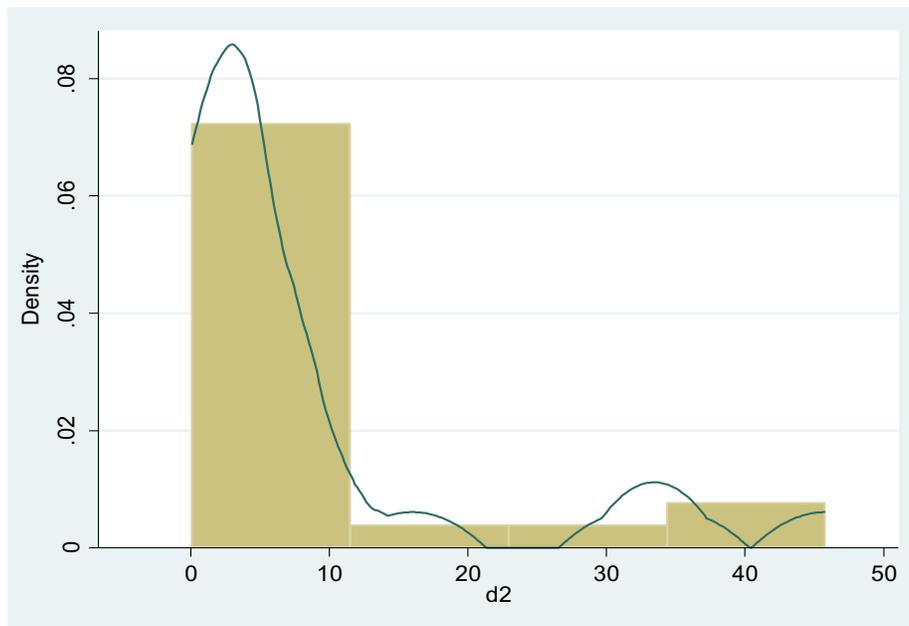
Grafica 3. Valor hipotético no paramétrico para la expresión de RD-D1 en los MNG's analizados en esta serie, Kurtosis= 4.463; Sesgo= 1.542.



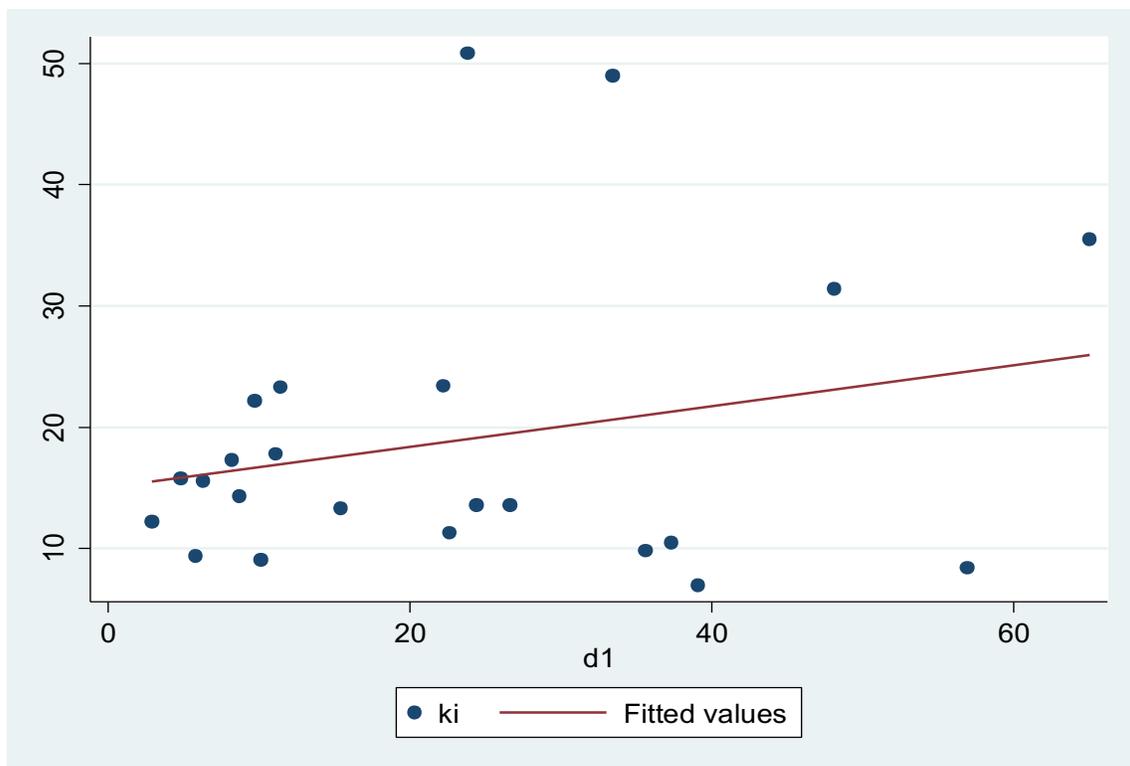
Grafica 4. Valor hipotético no paramétrico para la expresión de RD-D1 en los MNG's analizados en esta serie, Kurtosis= 2.866; Sesgo= 0.878.



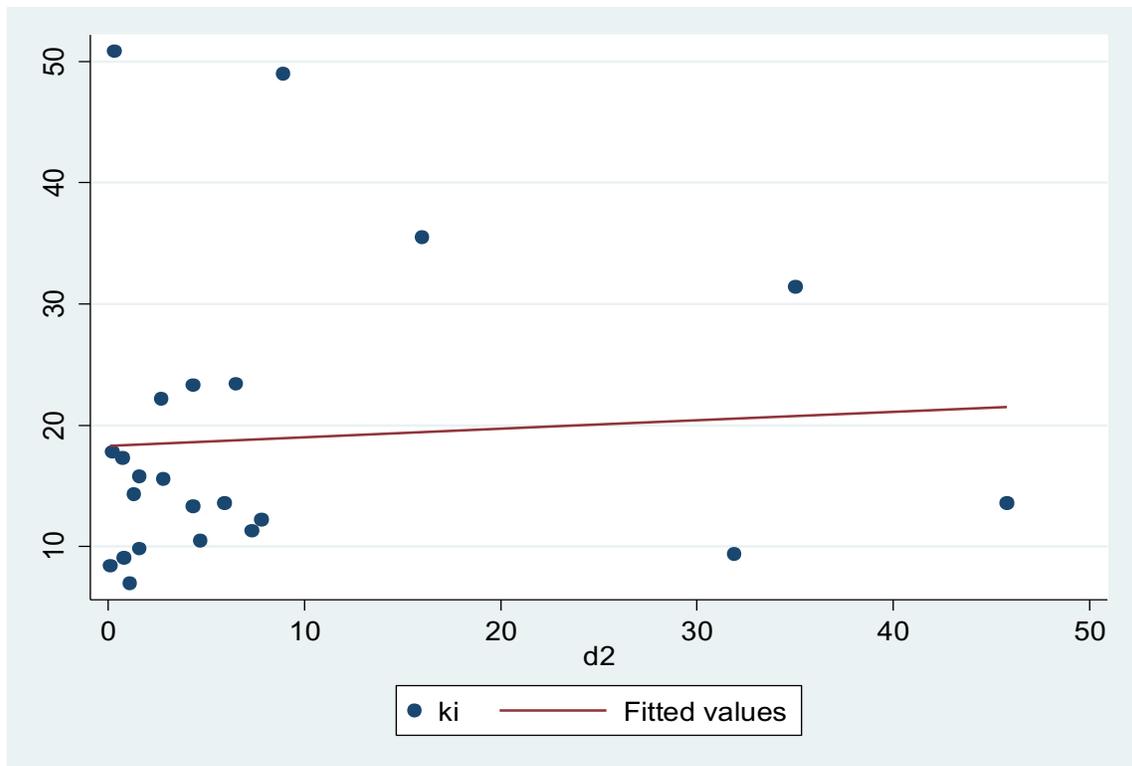
Grafica 5. Valor hipotético no paramétrico para la expresión de RD-D1 en los MNG's analizados en esta serie, Kurtosis= 5.767; Sesgo= 1.993.



Gráfica 6. Relación entre la expresión de Ki-67 y RD-D1. Coeficiente= 0.242 ($p=0.265$).



Gráfica 7. Relación entre la expresión de Ki-67 y RD-D2. Coeficiente= 0.07 (p= 0.749).



Gráfica 8. Relación entre la expresión de RD-D1 y RD-D2. Coeficiente= 0.205 (p= 0.348).

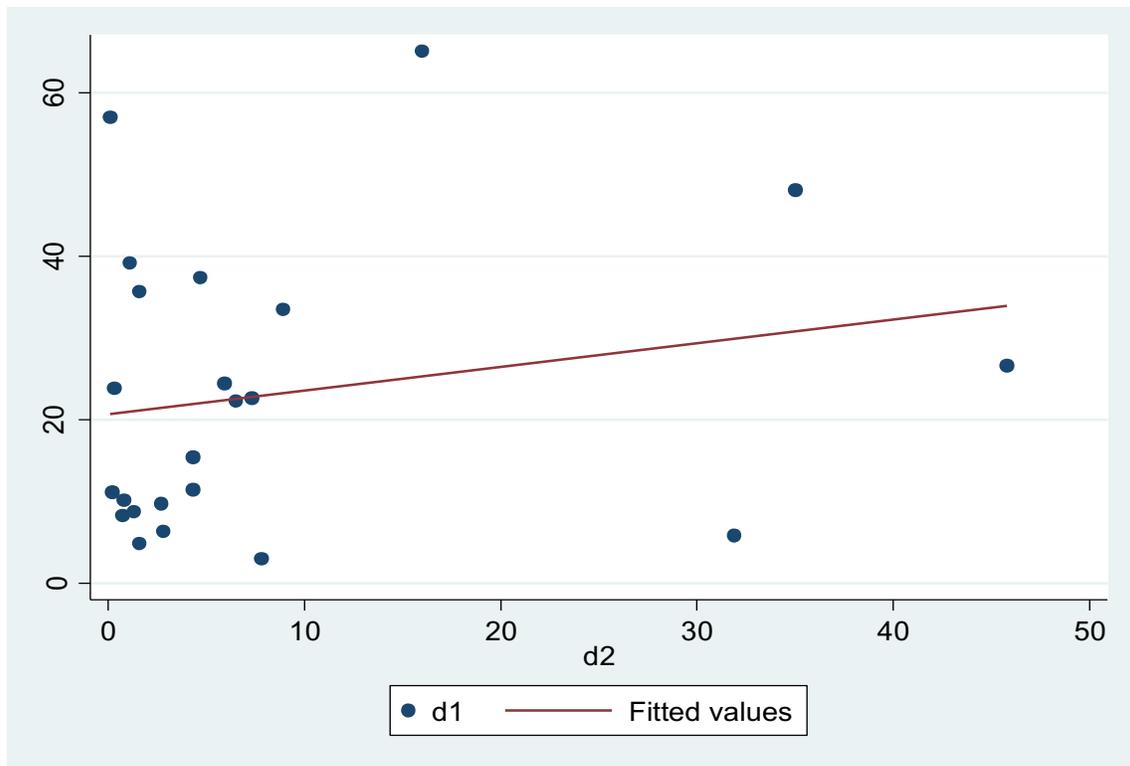


Figura 1. Biopsia B14-146/9 con nula expresión de Ki-67

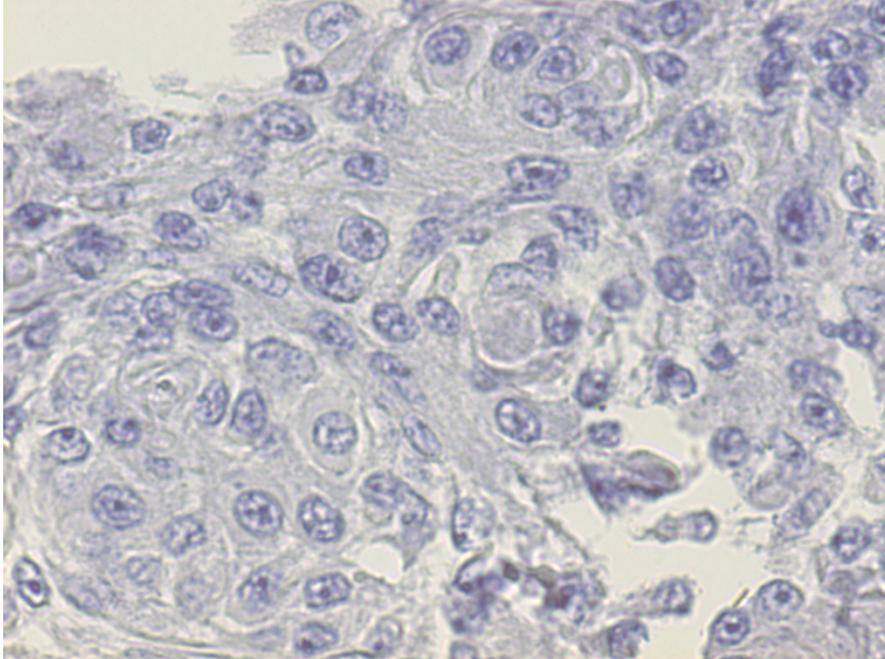


Figura 2. Biopsia B14-356/3 con nula expresión de Ki-67

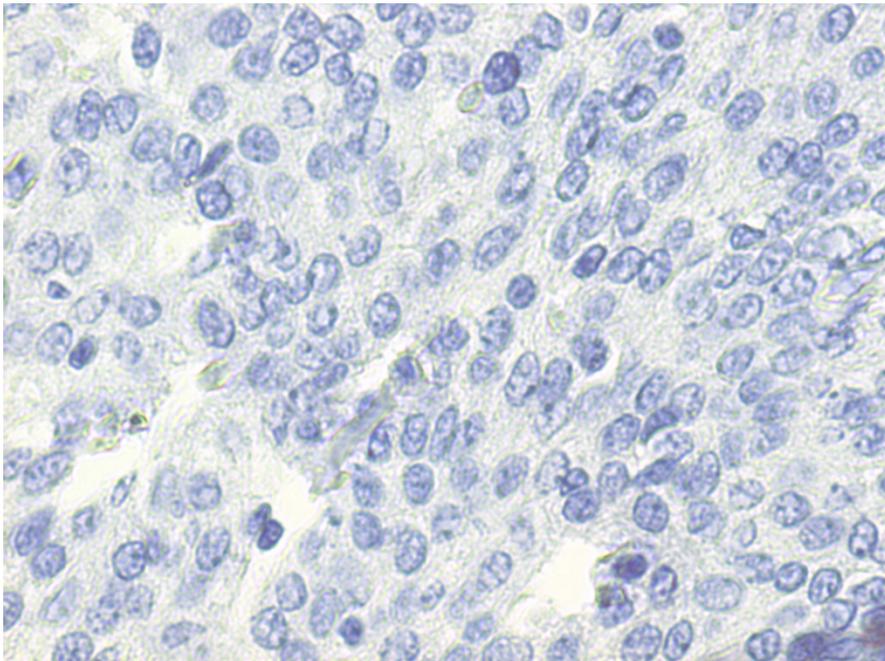


Figura 3. Biopsia B14-59/10 con nula expresión de Ki-67

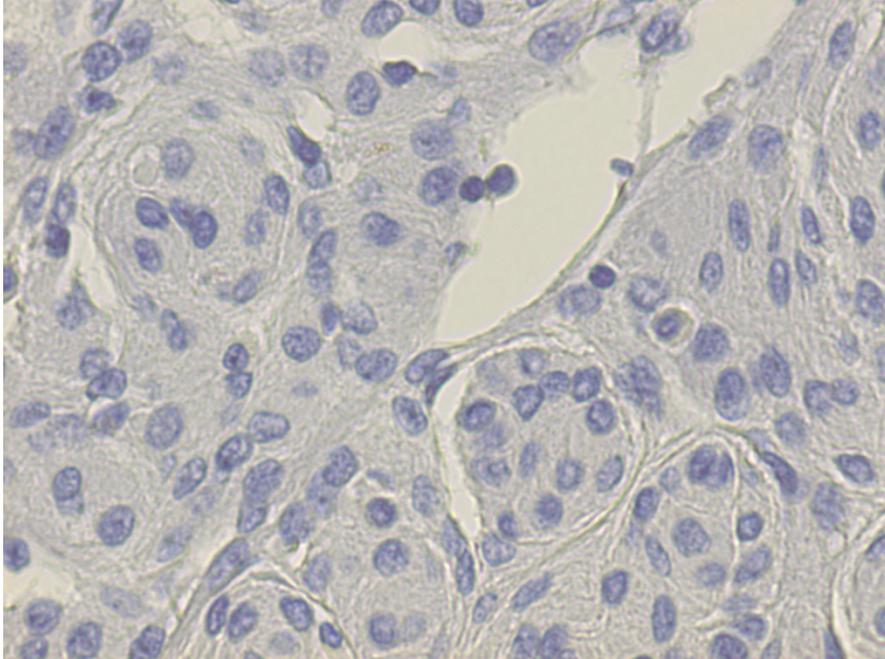


Figura 4. Biopsia B14-434/1 con bajo índice de expresión de Ki-67

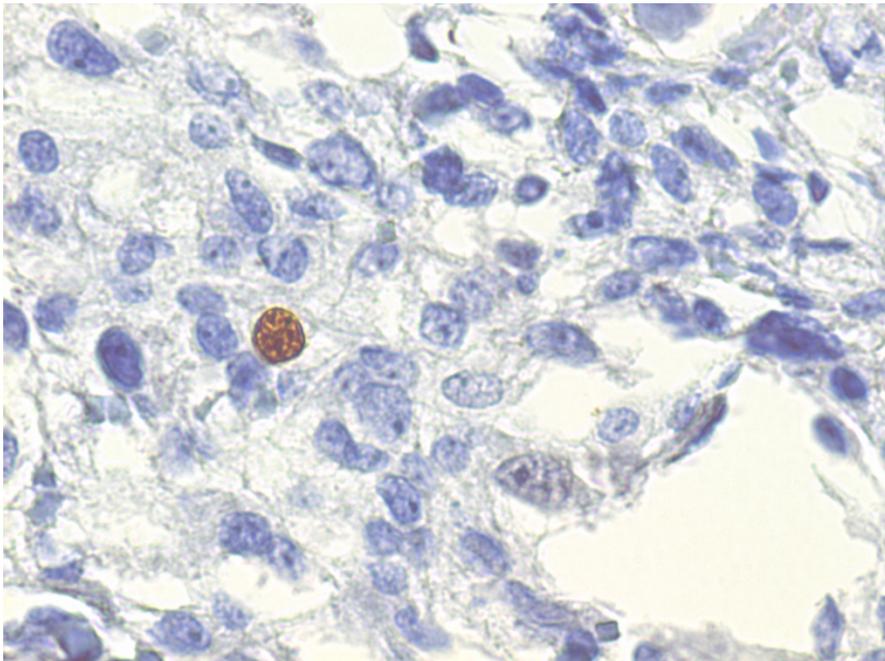


Figura 5. Biopsia B14-123/5 con bajo índice de expresión de Ki-67

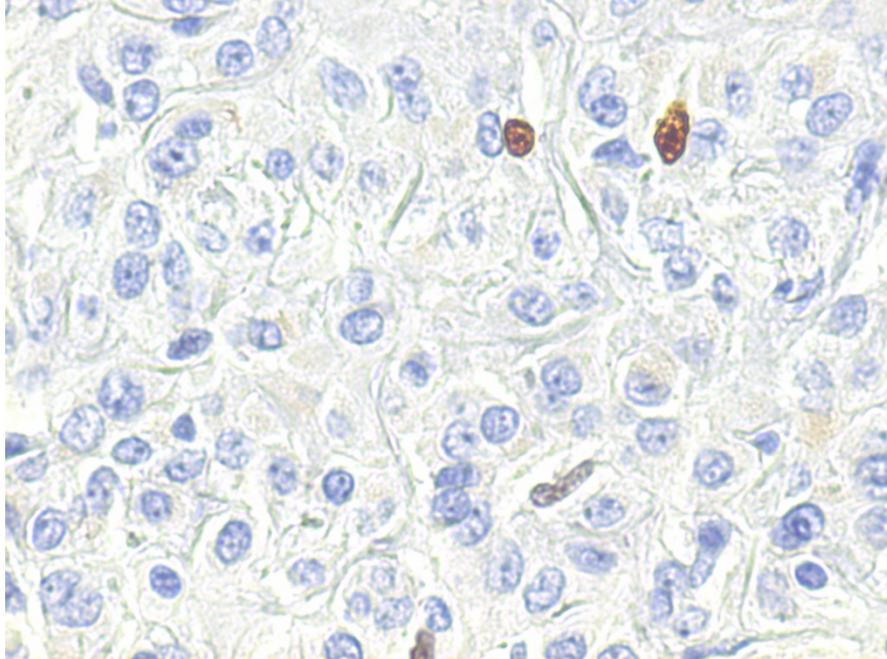


Figura 6. Biopsia B10-859/8 con bajo índice de expresión de Ki-67

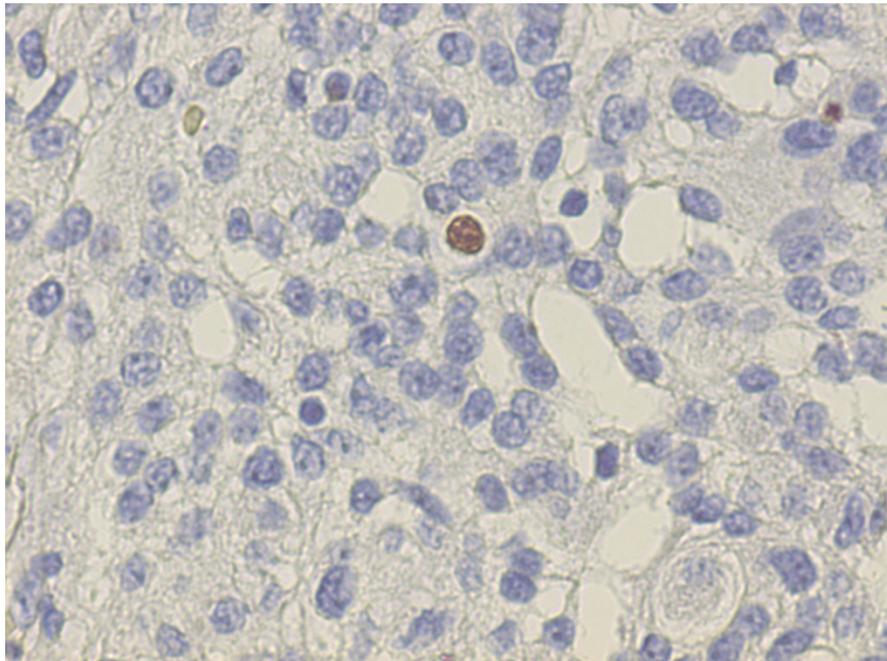


Figura 7. Biopsia B14-506/5 con expresión alta de Ki-67

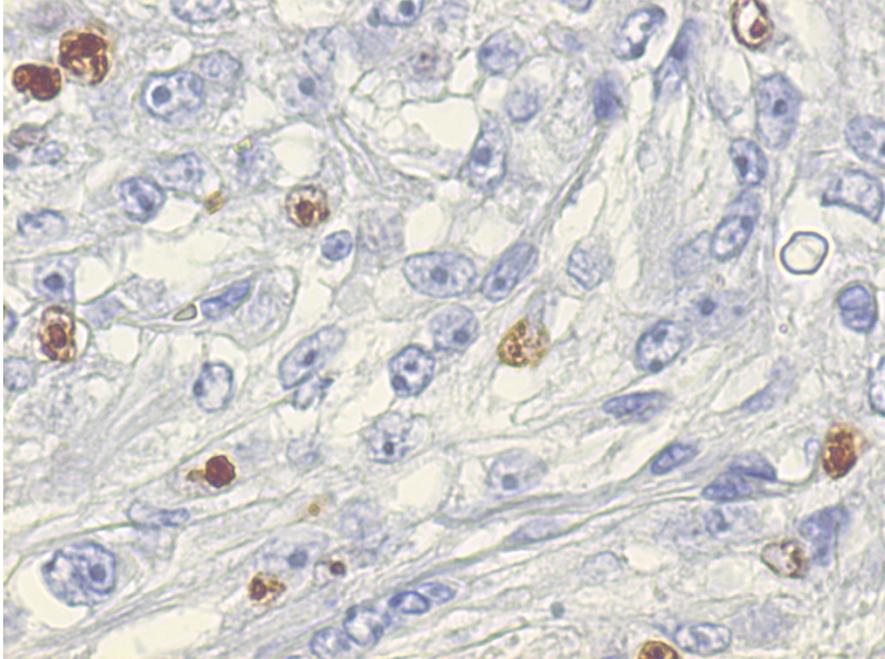


Figura 8. Biopsia B10-489/18 con expresión alta de Ki-67

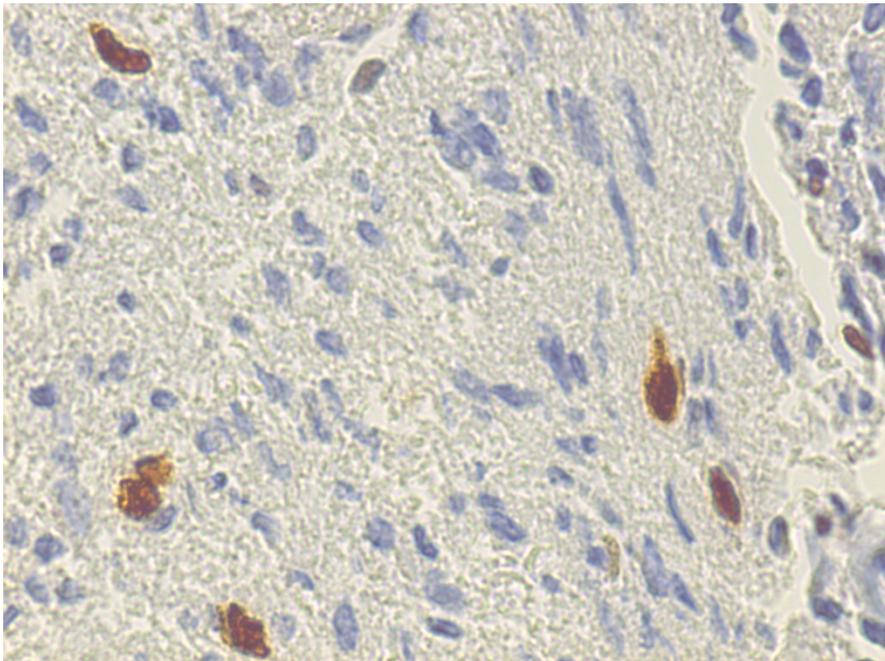


Figura 9. Biopsia B14-123/9 con expresión alta de Ki-67

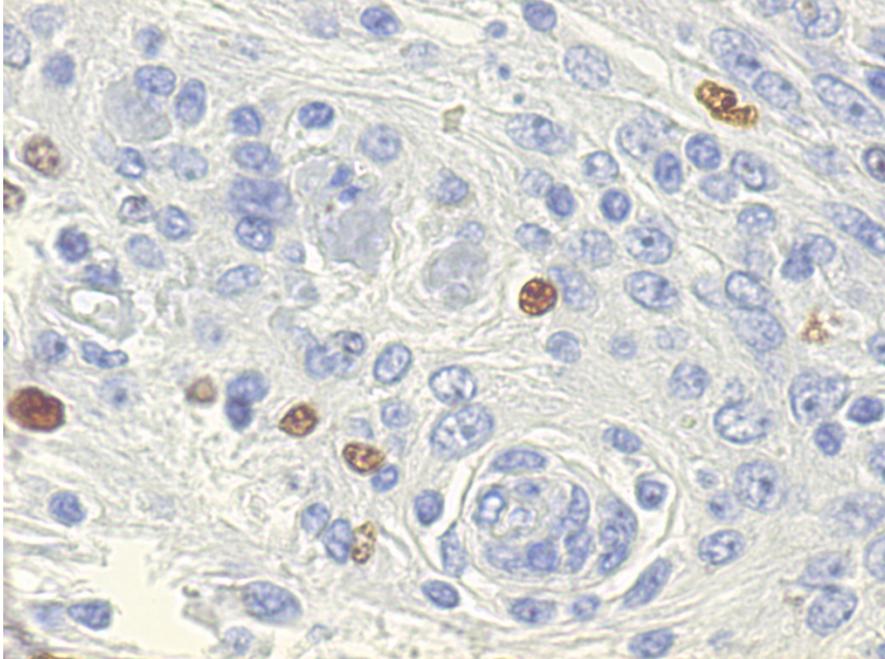
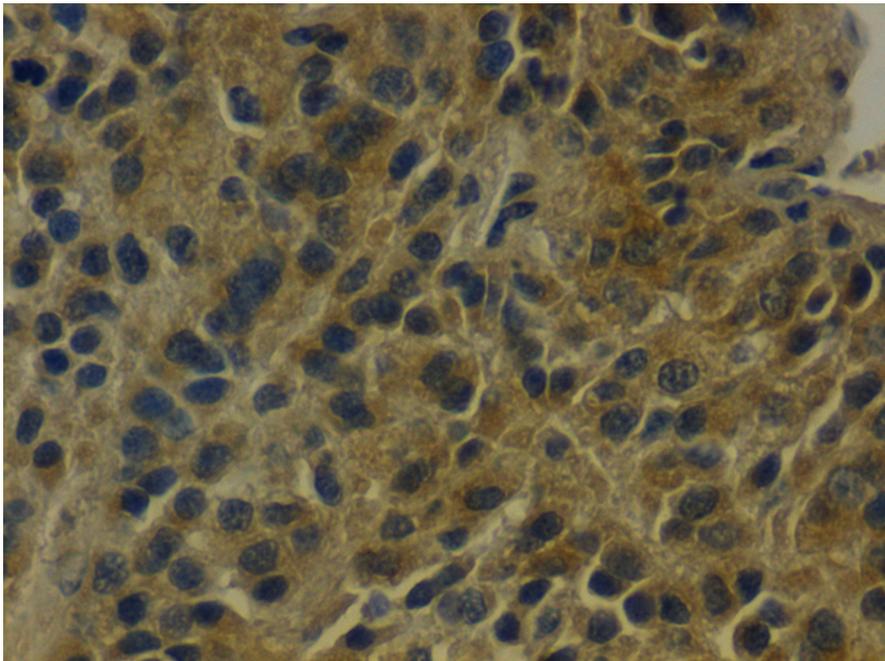


Figura 10. Inmunohistoquímica con alta expresión de RD-D1



DISCUSIÓN:

Este es un estudio innovador que nos brinda información interesante. Los MNG's que padece la población mexicana que se sometió a resección en el INNyN"MV" y que pudimos analizar en esta serie, no discrepan de lo publicado a nivel mundial, mayor afección en la quinta década de la vida y subtipo histológico más común el típico.^{43-45,58} La mayor afección de hombres que mujeres puede ser debido a nuestro pequeño número de pacientes. Es importante resaltar los MNG's que afectan la base del cráneo (tubérculo selar, esfenoidales, esfeno-orbitarios, clinoides, del seno cavernoso y petroclivales), un número muy alto en nuestra serie por el sesgo de ser un centro de referencia a nivel nacional. Lo que a su vez, al ser una localización de difícil acceso, con múltiples estructuras neurovasculares, provoca una mayor cantidad de MNG's residuales con mayor riesgo de recurrencia (90% en nuestra serie). Todo esto acentúa la necesidad que tenemos de encontrar nuevas opciones terapéuticas efectivas para estos pacientes, que nos ayuden a evitar la morbimortalidad acumulada con cada intervención. Además, tiene repercusión en todos los niveles, ya que ahorra a los sistemas de salud costos de hospitalización, cirugías e incapacidad.

Ki-67

El tipo de resección quirúrgica y los parámetros histológicos, son los principales predictores de recurrencia en MNG's. Entre más radical la resección menor la posibilidad de recurrencia.⁷⁻⁹ De tal manera que la tasa de recurrencia a 5 años para un paciente con resección total y un meningioma benigno puede ser de 0%.⁴⁸

Otras características que ayudan a predecir recurrencia son: MNG's multicéntricos, localización, edad, sexo y antecedente de radioterapia. Además, de ciertas características histológicas como: hipervascularidad, depósitos de hemosiderina, patrón laminado, nucléolos prominentes, mitosis, micronecrosis y pleomorfismo nuclear, correlacionan con recurrencia pero solo se observan en MNG's catalogados como atípicos o anaplásicos. Muchos estudios han demostrado disminución del intervalo libre de recurrencia cuando los MNG's se transforman de grado I a grado II o III. Sin embargo, hay MNG's que recurren y no muestran estas características histológicas, por lo que las hace inadecuadas para predecir recurrencia en resecciones totales.^{47,51}

Ho y cols. Proponen que para considerar un MNG como atípico debe cumplir con 2 de los siguientes 3 parámetros: pérdida de la arquitectura, mitosis $\geq 1.5/\text{mm}^2$ y necrosis. Por lo regular los tumores benignos no muestran invasión cerebral, sin embargo no hay un solo parámetro histológico para predecir recurrencia entre los MNG's benignos (grado I). El análisis de MNG's recurrentes ha encontrado que el intervalo de tiempo para recurrencia se asocia con el potencial de proliferación demostrado con MIB-1 LI (Ki-67).⁴⁸

El Ki-67 es un marcador nuclear de proliferación celular que ha sido utilizado para asociarlo con los diferentes grados histológicos de MNG, demostrando más actividad en casos malignos.^{46,48,51,53} Además, es una herramienta para predecir recurrencia con la ventaja de ser rápido, confiable, barato y permitir una correlación morfológica directa.⁵¹ La expresión antigénica del MIB-1 aumenta con la progresión del ciclo celular, crece durante la mitad tardía de la fase S y alcanza un pico en la

fase G₂, la fase M y en líneas celulares malignas; y está ausente en la fase G₀ y la fase temprana de la fase G₁.^{49,50}

Los MNG's benignos no recurrentes muestran índices bajos de MIB-1, mientras los valores son altos en MNG's benignos recurrentes, atípicos y anaplásicos. La diferencia del índice de MIB-1 entre benignos no recurrentes y benignos recurrentes es estadísticamente significativa; mientras que entre MNG's benignos recurrentes y MNG's atípicos esta diferencia no es significativa. Por lo tanto el índice de MIB-1 tiene un valor real para predecir recurrencia tumoral en MNG's benignos, que subsecuentemente muestran características de MNG's atípicos.^{48-50,54-57} La hipótesis es que durante el proceso de transformación de grado tumoral, las células están biológicamente activas (lo que se evidencia por su potencial proliferativo), pero aun no muestran características histológicas de MNG atípico.⁵² Esta positividad nuclear se observa en la periferia del espécimen (células que se encuentran en la fase no-G₀), mientras las células del centro están en fase G₀, lo que sugiere que el MIB-1 debe analizarse en la parte periférica del tumor para conocer el potencial proliferativo exacto.⁵²

RD-D2

La expresión de RD ha demostrado ser negativa mediante análisis de Scatchard, detectable en algunos casos mediante Northern blot y positiva en el 100% de los casos mediante RCP (secuencia del RD-D2).^{31,33}

Al emplear un método cualitativo para análisis inmunohistoquímico, dado las características sincitiales de estas neoplasias, se ha detectado hasta 93.6% de positividad para RD-D2. Sin asociación significativa entre su expresión y género,

edad, recurrencia o crecimiento.^{32,59} A la fecha es el único reporte relacionado a la expresión inmunohistoquímica de RD-D2 en MNG's para hacer una comparación de resultados. La presencia de estos RD-D2 en más del 90% de los MNG's analizados, incluidos los histológicamente malignos (analizaron OMS grado I, II y III), merecen investigaciones adicionales del potencial terapéutico de los AD para tratar estos tumores.

Este es el único estudio con el que podemos comparar nuestros resultados. Sin embargo, ellos no mencionan su índice de expresión, únicamente que encontraron RD-D2 en más del 90% de las muestras que analizaron.

CONCLUSION:

Resultaba interesante analizar los resultados que existían en cuanto a la respuesta antiproliferativa que habían demostrado tener las células de MNG's a potentes AD que actúan predominantemente sobre los RD-D2 (cabergolina y bromocriptina), con mínimo efecto sobre el RD-D1. Por un momento consideramos que había que seguir esa línea de investigación y al haber predominio de RD-D1 en este tipo de tumores, buscar una mejor respuesta antiproliferativa con un AD más potente sobre el RD-D1. Entonces este sería el RD involucrado en el control del crecimiento y el objetivo terapéutico.

Al mismo tiempo nos preguntamos si era una ausencia real del RD-D2, o lo que estaba fallando era el método de detección. Considerando que la estimulación del RD-D2 es la que desencadena una respuesta intracelular inhibidora.

Ahora sabemos que los MNG's expresan RD-D2 detectados mediante inmunohistoquímica. Posteriores estudios, prospectivos, multicéntricos y con mayor población de estudio nos ayudarán a determinar si al ser estimulados con AD se puede lograr un efecto antiproliferativo *in-vivo*.

REFERENCIAS

1. **Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ, Schymura MJ, Ries LA, Ehemann C, et al.** Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(9):714-36.
2. **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:v1-49.
3. **Wiemels J, Wrensch M, Claus EB.** Epidemiology and etiology of meningioma. *J Neurooncol* 2010;99(3):307-14.
4. **Lamszus K.** Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63(4):275-86.
5. **Louis DN, Scheithauer BW, Budka H:** Meningeal tumors, en Kleihues P, Cavenee WK (eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon: IARC, 2000, pp 175–196.
6. **Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G.** Molecular pathogenesis of meningiomas. *J Neurooncol* 2004;70(2):183-202.
7. **Simpson D.** The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957;20(1):22-39.
8. **Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL.** Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg* 1985;62(1):18-24.

9. **Adegbite AB, Khan MI, Paine KW, Tan LK.** The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurosurg* 1983;58(1):51-6.
10. **Mathiesen T, Lindquist C, Kihlström L, Karlsson B.** Recurrence of cranial base meningiomas. *Neurosurgery* 1996;39(1):2-7; discussion 8-9.
11. **Couldwell WT, Cole CD, Al-Mefty O.** Patterns of skull base meningioma progression after failed radiosurgery. *J Neurosurg* 2007;106(1):30-5.
12. **Mathiesen T, Kihlström L, Karlsson B, Lindquist C.** Potential complications following radiotherapy for meningiomas. *Surg Neurol* 2003;60(3):193-8; discussion 199-200.
13. **Al-Mefty Ossama, et al.** *Al-Mefty's Meningiomas* 2011 Thieme 2nd edition.
14. **Norden AD, Drappatz J, Wen PY.** Targeted drug therapy for meningiomas. *Neurosurg Focus* 2007;23:E12.
15. **Chamberlain MC, Barnholtz-Sloan JS.** Medical treatment of recurrent meningiomas. *Expert Rev Neurother* 2011;11(10):1425-32.
16. **Brem SS, Bierman PJ, Brem H, Butowski N, Chamberlain MC, Chiocca EA, et al;** National Comprehensive Cancer Network. Central nervous system cancers. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9(4):352-400.
17. **Chamberlain MC.** The role of chemotherapy and targeted therapy in the treatment of intracranial meningioma. *Curr Opin Oncol* 2012;24(6):666-71.
18. **Moazzam AA, Wagle N, Zada G.** Recent developments in chemotherapy for meningiomas: a review. *Neurosurg Focus* 2013;35(6):E18.
19. **Prasad KN.** Effect of dopamine and 6-hydroxydopamine on mouse neuroblastoma cells in vitro. *Cancer Res* 1971;31:1457-60.

20. **Wick MM.** Dopamine: a novel antitumor agent active against B-16 melanoma in vivo. *J Invest Dermatol* 1978;71:163-4.
21. **Johansen PW, Haug E, Gautvik KM.** Effects of bromocriptine on hormone production and cell growth in cultured rat pituitary cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985;110:200-6.
22. **Markaverich BM, Gregory RR, Alejandro MA.** Intracellular [3H]dopamine binding sites in normal and malignant cells: relationships to cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:391-400.
23. **Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG.** Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998;78(1):189-225.
24. **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(6):1486-94.
25. **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 29;206(1-2):49-62.
26. **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:S13-21.
27. **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(2):134-7.

28. **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(5):750-5.
29. **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(6):1669-71.
30. **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(2):288-94.
31. **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;38(2):367-75.
32. **Trott G, Pereira-Lima JF, Leães CG, Ferreira NP, Barbosa-Coutinho LM, Oliveira MC.** Abundant immunohistochemical expression of dopamine D2 receptor and p53 protein in meningiomas: follow-up, relation to gender, age, tumor grade, and recurrence. *Braz J Med Biol Res* 2015;48(5):415-9.
33. **Rowe J, Grainger A, Walton L, Silcocks P, Radatz M, et al.** Risk of malignancy after gamma knife stereotectic radiosurgery. *Neurosurg* 2007;60:60-65; discussion 65-66.

34. **Loven D, Hardoff R, Sever ZB, Steinmetz AP, Gornish M, et al.** Non-resectable slow-growing meningiomas treated by hydroxyurea. *J Neurooncol* 2004;67:221-6.
35. **Mason WP, Gentili F, Macdonald DR, Hariharan S, Cruz CR, et al.** Stabilization of disease progression by hydroxyurea in patients with recurrent or unresectable meningioma. *J Neurosurg* 2002;97:341-6.
36. **Newton HB, Scott SR, Volpi C.** Hydroxyurea chemotherapy for meningiomas: enlarged cohort with extended follow-up. *Br J Neurosurg* 2004;18:495-9.
37. **Rosenthal MA, Ashley DL, Cher L.** Treatment of high risk or recurrent meningiomas with hydroxyurea. *J Clin Neurosci* 2002;9:156-8.
38. **Chamberlain MC, Johnston SK.** Hydroxyurea for recurrent surgery and radiation refractory meningioma: a retrospective case series. *J Neurooncol* 2011;104:765-71.
39. **Hahn BM, Schrell UM, Sauer R, Fahlbusch R, Ganslandt O, et al.** Prolonged oral hydroxyurea and concurrent 3d-conformal radiation in patients with progressive or recurrent meningioma: results of a pilot study. *J Neurooncol* 2005;74:157-65.
40. **Chamberlain MC, Glantz MJ, Fadul CE.** Recurrent meningioma: salvage therapy with long-acting somatostatin analogue. *Neurology* 2007;69:969-73.
41. **Norden AD, Ligon KL, Hammond SN, Muzikansky A, Reardon DA, et al.** Phase II study of monthly pasireotide LAR (SOM230C) for recurrent or progressive meningioma. *Neurology* 2015;84:280-6.

42. **Chamberlain MC, Glantz MJ.** Interferon-alpha for recurrent World Health Organization grade 1 intracranial meningiomas. *Cancer* 2008;113(8):2146-51.
43. **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):v1-49.
44. **Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM.** Meningiomas and hormonal receptors. Immunohistochemical study in typical and non-typical tumors. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56(2):193-9.
45. **Claus EB, Bondy ML, Schildkraut JM, Wiemels JL, Wrensch M, et al.** Epidemiology of intracranial meningioma. *Neurosurgery* 2005;57(6):1088-95; discussion 1088-95.
46. **Maiuri F, De Caro MB, Esposito F, Cappabianca P, Strazzullo V, et al.** Recurrences of meningiomas: predictive value of pathological features and hormonal and growth factors. *J Neurooncol* 2007;82(1):63-8.
47. **de la Monte SM, Flickinger J, Linggood RM.** Histopathologic features predicting recurrence of meningiomas following subtotal resection. *Am J Surg Pathol* 1986;10(12):836-43.
48. **Ho DM, Hsu CY, Ting LT, Chiang H.** Histopathology and MIB-1 labeling index predicted recurrence of meningiomas: a proposal of diagnostic criteria for patients with atypical meningioma. *Cancer* 2002;94(5):1538-47.
49. **Guillaud P, du Manoir S, Seigneurin D.** Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal

- fibroblastic (MRC-5) and mammary tumour cell lines (MCF-7). *Anal Cell Pathol* 1989;1(1):25-39.
50. **Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, et al.** Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 1989 Apr;92 (Pt 4):531-40.
51. **Langford LA, Cooksley CS, DeMonte F.** Comparison of MIB-1 (Ki-67) antigen and bromodeoxyuridine proliferation indices in meningiomas. *Hum Pathol* 1996;27(4):350-4.
52. **Vankalakunti M, Vasishta RK, Das Radotra B, Khosla VK.** MIB-1 immunolabeling: a valuable marker in prediction of benign recurring meningiomas. *Neuropathology* 2007;27(5):407-12.
53. **Ohta M, Iwaki T, Kitamoto T, Takeshita I, Tateishi J, et al.** MIB1 staining index and scoring of histologic features in meningioma. Indicators for the prediction of biologic potential and postoperative management. *Cancer* 1994;74(12):3176-89.
54. **Izycka-Swieszewska E, Rzepko R, Borowska-Lehman J, Baranowska E, Warzocha D.** Recurrent meningiomas- the immunohistochemical analysis of angiogenesis and celular proliferation. Preliminary study. *Folia Neuropathol* 1999;37(3):179-84.
55. **Karamitopoulou E, Perentes E, Tolnay M, Probst A.** Prognostic significance of MIB-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. *Hum Pathol* 1998;29(2):140-5.

56. **Devaprasath A, Chacko G.** Diagnostic validity of the Ki-67 labeling index using the MIB-1 monoclonal antibody in the grading of meningiomas. *Neurol India* 2003;51(3):336-40.
57. **Lanzafame S, Torrisi A, Barbagallo G, Emmanuele C, Alberio N, et al.** 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.
58. **Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM.** Meningiomas and hormonal receptors. Immunohistochemical study in typical and non-typical tumors. *Arq Neuropsiquiatr* 1998;56(2):193-9.
59. **Russell DS, Rubinstein LJ.** Pathology of tumours of the nervous system. 5th ed. London: Edward Arnold; 1989.