

COMPONENTE OLIGODENDROGLIAL E NEURONAL EM GLIOBLASTOMAS

Possível relação com o prognóstico

Luciana Wernersbach Pinto¹, Leila Chimelli²

RESUMO - Glioblastomas são tumores astrocíticos de alto grau de malignidade e o diagnóstico baseado nos critérios histológicos atuais não tem explicado a maior sobrevida observada em alguns casos. A presença de um componente oligodendroglial foi proposta mais recentemente como um possível indicador de maior sobrevida, tanto pela OMS quanto pela classificação de Sainte Anne 2000. Esta última propõe ainda que um componente neuronal está relacionado com maior sobrevida. O objetivo deste estudo foi rever tumores de 40 pacientes diagnosticados como glioblastomas pelos critérios da OMS, com o propósito de identificar: a presença de um componente oligodendroglial utilizando critérios morfológicos; a presença de um componente neuronal utilizando marcadores imuno-histoquímicos (anticorpos anti-neurofilamento e sinaptofisina). Objetivou-se também correlacionar os achados histológicos e imuno-histoquímicos com a sobrevida dos pacientes, estudando também outras variáveis que podem ter influência na sobrevida. Foram identificados 11 tumores com componente oligodendroglial e 7 com componente neuronal. Apesar do pequeno número de casos estudados, a presença de um componente oligodendroglial associou-se com maior sobrevida. O valor da expressão de marcadores neuronais em gliomas malignos precisa ser confirmado com a avaliação de séries maiores.

PALAVRAS-CHAVE: glioblastomas, componente oligodendroglial, tumores glioneuronais, prognóstico.

Oligodendroglial and neuronal component in glioblastomas: possible relation with prognosis

ABSTRACT - Glioblastomas are high grade astrocytic tumors and current histology criteria does not explain the longer survival in some cases. Presence of oligodendroglial component has been suggested as possible marker for better outcome by the international WHO Working Group of experts and by the proponents of the Sainte-Anne Hospital Classification (2000). The latter also states that a neuronal component is associated with better survival. The aim of this study was to analyze a series of 40 patients with tumors classified as glioblastomas based on the WHO criteria, in order to identify: the presence of an oligodendroglial component, using morphologic criteria; the presence of a neuronal component, using immunohistochemical markers (antibodies anti-neurofilament and synaptophysin). The histological and immunohistochemical findings were correlated with patients' survival and other variables of possible prognostic significance were also studied. Oligodendroglial component was identified in 11 cases and neuronal component in 7. Despite the small number of patients studied, this review detected a longer survival in patients with oligodendroglial component. The significance of expression of neuronal markers in malignant gliomas is still to be confirmed, with the evaluation of larger series.

KEY WORDS: glioblastomas, oligodendroglial component, glioneuronal tumors, prognosis.

Glioblastomas (GBM) são tumores astrocíticos de alto grau de malignidade, que afetam principalmente adultos entre 45 e 70 anos e estão localizados preferencialmente nos hemisférios cerebrais, na substância branca sub-cortical¹. O aspecto histológico destes tumores é extremamente variável e o diagnóstico é baseado no padrão tecidual. Apesar

do tratamento agressivo com radioterapia e quimioterapia, a sobrevida costuma ser inferior a 12 meses. No entanto, maior sobrevida tem sido observada em alguns casos e fatores prognósticos clínicos têm sido relacionados com este fato. Embora alguns estudos já tenham tentado relacionar características histológicas destes tumores com a sobrevida dos pa-

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) Rio de Janeiro RJ, Brasil: ¹Pós graduando, ²Professor Titular. Apoio: CNPQ.

Recebido 19 Abril 2004, recebido na forma final 30 Junho 2004. Aceito 6 Agosto 2004.

Dra. Leila Chimelli - Serviço de Anatomia Patológica, Hospital Universitário - UFRJ - Ilha do Fundão - 21941-590 Rio de Janeiro RJ - Brasil. E-mail: chimelli@hucff.ufrj.br

cientes, estas não vinham sendo muito valorizadas^{2,3}. Mais recentemente, a presença do componente oligodendroglial vem sendo proposto como um indicador de maior sobrevida, tanto pela OMS quanto pela classificação de Sainte Anne 2000. A OMS sugere atualmente a utilização do termo glioblastoma com componente oligodendroglial (GBMo) e questiona se a distinção destes tumores dos GBM clássicos identificará um subgrupo de pacientes que responderá melhor à quimioterapia e/ou terá um prognóstico melhor, sem, no entanto, propor critérios histológicos reproduzíveis para a distinção destes tumores dos oligoastrocitomas e oligodendrogliomas anaplásicos⁴. A ausência de reprodutibilidade e o fato de basear-se no tipo citológico predominante são também criticadas por Daumas-Duport et al. que propuseram uma outra classificação para os gliomas do adulto (classificação de Sainte Anne, 2000)⁵. Esta propõe separar aqueles tumores que têm algum componente oligodendroglial usando critérios restritivos, devendo estes ser classificados como oligodendrogliomas e oligoastrocitomas anaplásicos e sugere ainda que alguns destes tumores têm um componente neuronal, identificado através da imuno-histoquímica, principalmente nos gliomas malignos que apresentam um aspecto radiológico ou clínico atípicos. A sobrevida dos pacientes com estes tumores seria intermediária entre a dos GBM clássicos e a dos GBMo.

O objetivo deste estudo foi rever tumores do sistema nervoso central (SNC) previamente diagnosticados como glioblastomas, com o propósito de identificar: a presença de um componente oligodendroglial utilizando critérios morfológicos; a presença de um componente neuronal utilizando marcadores imuno-histoquímicos (anticorpos anti-neurofilamento e sinaptofisina). Objetivou-se ainda correlacionar os achados histológicos e imuno-histoquímicos com a sobrevida dos pacientes, estudando também outras variáveis que podem ter influência na sobrevida como a idade, sexo, tratamentos adjuvantes e extensão da ressecção.

MÉTODO

Informações clínicas – Foram estudados retrospectivamente tumores do SNC, previamente classificados como glioblastoma segundo os critérios da OMS, de 40 pacientes. As informações clínicas coletadas foram: idade, sexo, data do diagnóstico, localização do tumor, tratamentos realizados (cirurgia, radioterapia, quimioterapia), estado atual, data do óbito e extensão da ressecção realizada (total ou parcial). O tempo de sobrevida foi considerado como o tempo desde a data do diagnós-

tico até a data do óbito ou até a data do encerramento da coleta de dados, para os pacientes que chegaram vivos ao final desta.

Análise histológica – Os casos foram revistos por 2 observadores, separando os glioblastomas clássicos daqueles tumores que tivessem alguma evidência de componente oligodendroglial (GBMo). Os casos que apresentaram alguma dificuldade na interpretação ou controvérsia foram vistos também por um terceiro observador.

Estudo imuno-histoquímico – Todos os tumores foram submetidos à reação imuno-histoquímica pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase utilizando anticorpos primários para sinaptofisina (NCL-SYNAP-299, diluição 1:100, Novocastra) e anti-neurofilamento (M0762, diluição 1:70, DAKO). O anticorpo secundário utilizado foi uma imunoglobulina biotinilada universal (kit universal ABC, Novocastra). Os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização, recuperação antigênica em panela de pressão e bloqueio da peroxidase endógena usando solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários sinaptofisina (diluição 1:100) e anti-neurofilamento (diluição 1:70), *overnight*, em câmara úmida, em seguida incubadas com o anticorpo secundário e finalmente com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) por 30 minutos. Seguiu-se a revelação com solução de diaminobenzidina, contracoloração com hematoxilina de Harris, desidratação e montagem. A marcação imuno-histoquímica foi considerada positiva quando identificada em células claramente tumorais, algumas em mitose.

Análise estatística – Foram confeccionadas curvas de sobrevida para cada variável de interesse (idade, sexo, diagnóstico histopatológico, tratamento adjuvante e extensão da ressecção), utilizando o método do estimador da fórmula produto limite de Kaplan-Meier. Para comparar as curvas de sobrevida acumulada entre as diferentes categorias de uma mesma variável foi utilizado o teste Log-rank. Para avaliação do efeito conjunto das variáveis independentes foram calculadas as razões de risco (HR) com intervalos de confiança de 95%, seguindo-se o modelo de riscos proporcionais de Cox. Toda a análise foi feita utilizando-se o programa estatístico STATA, módulo ST, versão 7. Diferenças de *p* valores menores que 0,05 foram consideradas estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Dados clínicos e localização dos tumores – Os 40 pacientes apresentaram idades variando entre 30 e 78 anos, sendo 29 do sexo masculino (73%) e 11 do sexo feminino (28%). A sobrevida dos pacientes variou entre 7 dias (1 caso com óbito no pós-operatório) e 31 meses. No momento do encerra-

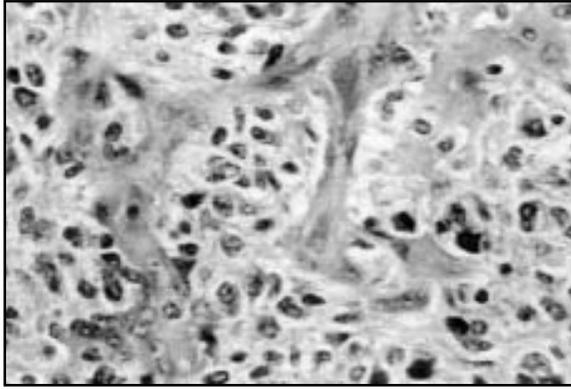


Fig 1. Componente oligodendroglial com aspecto em colméia, capilares ramificados e halos perinucleares (200X).

mento da coleta de dados, 2 dos 40 pacientes estavam vivos, um deles com sobrevida de 10 meses e o outro com 31 meses (maior sobrevida observada). Em nenhum dos casos havia história prévia de glioma de baixo grau. A localização dos tumores foi bastante variável, sendo o lobo frontal o sítio mais freqüente (13 casos), seguido do lobo temporal (10 casos).

Características histológicas – A presença de um componente oligodendroglial foi observada em 11 casos (28%) (Fig 1). Outra característica identificada foi a presença de células gigantes, sendo este tipo celular proeminente em 5 casos.

Estudo imuno-histoquímico – O achado de positividade para marcadores neuronais nos tumores com componente oligodendroglial não foi valorizado, pois está amplamente descrito nestes tumores^{6,7}. Nos tumores sem componente oligodendroglial a

positividade foi observada em 7 casos, sempre focal, em células isoladas, algumas em mitose (Fig 2). Estes casos foram designados nesta série como GBMn (glioblastomas com componente neuronal).

Tratamento e extensão da ressecção – Entre os 40 pacientes, 36 foram submetidos à ressecção. Vinte e seis pacientes receberam tratamento adjuvante, 18 com radioterapia e 8 com radio e quimioterapia. Informações sobre a extensão da ressecção foram obtidas em apenas 14 pacientes. Destes, 9 foram submetidos a uma ressecção parcial e 5 à ressecção total.

Análise estatística – A sobrevida média global foi 11,5 meses (± 8), com índice de sobrevida em 31 meses de 2,65%. A sobrevida média para cada grupo, segundo o diagnóstico, foi 17,7 meses ($\pm 8,3$) para os GBMo, 12,6 meses (± 10) para os GBMn e 8 meses (± 5) para os pacientes com glioblastomas clássicos.

Na análise de sobrevida foi observada diferença significativa no tempo de sobrevida dos pacientes segundo o diagnóstico final (Fig 3). Aqueles com GBMo tiveram sobrevida maior do que os com componente neuronal ou com glioblastomas clássicos. Os pacientes tratados com radioterapia (RXT) e quimioterapia (QT) também tiveram sobrevida maior do que os que só fizeram radioterapia e do que os que não fizeram tratamento adjuvante.

A análise múltipla mostrou que os pacientes com glioblastomas clássicos tiveram risco de morrer 3,99 vezes maior que os com GBMo. Os pacientes que não fizeram tratamento adjuvante mostraram risco 5,64 vezes maior do que aqueles que fizeram RXT e QT e os que só fizeram RXT apresentaram

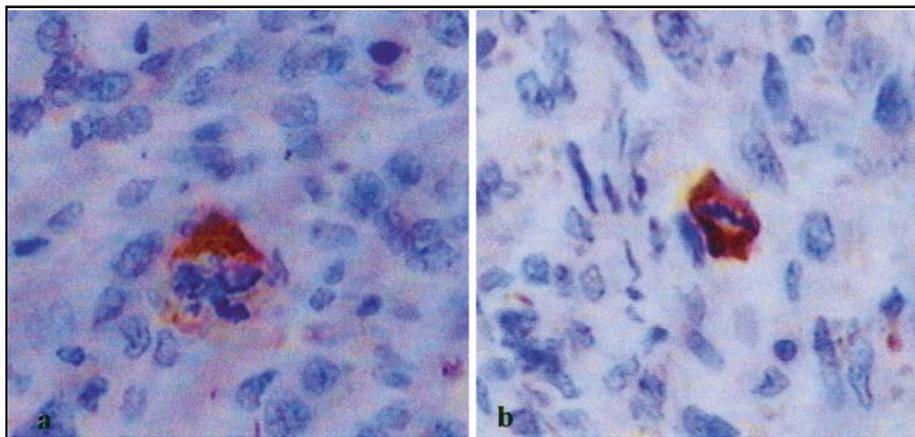


Fig 2. Glioblastomas com componente neuronal. Observar as células em mitose com positividade para neurofilamento (a) e (b) (200X).

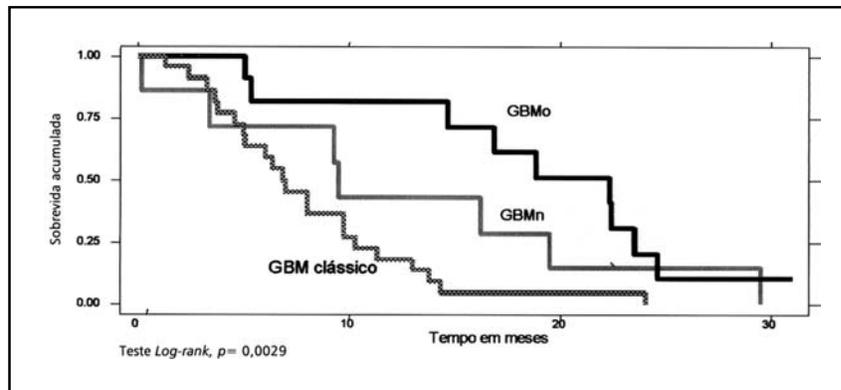


Fig 3. Curvas de sobrevida segundo o diagnóstico histopatológico.

risco 3,35 vezes maior do que os que fizeram RXT e QT. Não houve diferença de risco estatisticamente significativa entre os sexos, faixas etárias e extensão da ressecção.

DISCUSSÃO

Tumores que não se enquadram perfeitamente em nenhuma das categorias propostas pela OMS vêm sendo descritos e a tentativa de classificá-los em uma destas categorias pode ser a causa de comportamentos não usuais. Neste estudo observamos ser possível identificar entre os gliomas malignos, particularmente entre os previamente classificados como glioblastomas, aqueles que apresentam características histológicas e imuno-histoquímicas distintas, observando-se que o componente oligodendroglial relacionou-se com maior sobrevida.

A presença do componente oligodendroglial como um indicador de maior sobrevida é dado que vem sendo investigado, principalmente após a constatação de que alterações citogenéticas presentes em oligodendrogliomas anaplásicos estão relacionadas à quimiossensibilidade e maior sobrevida, o que tem levado a um interesse na investigação destas alterações em gliomas⁸⁻¹⁰. O presente estudo utilizou critérios exclusivamente morfológicos para a identificação do componente oligodendroglial, pois até recentemente não existiam marcadores imuno-histoquímicos para a identificação de oligodendrócitos tumorais. No entanto, devemos considerar a possibilidade de dificuldades na interpretação histológica, com a variação entre observadores sendo frequentemente descrita^{5,11}. Alguns estudos recentes têm demonstrado a utilização dos anticorpos Olig1 e Olig2, com bons resultados, porém estes ainda não estão disponíveis comercialmente^{12,13}.

Se por um lado é bastante promissor o papel do componente oligodendroglial na maior sobrevida observada para os pacientes com GBMo, o mesmo não se pode dizer dos tumores com imuno-positividade para marcadores neuronais, sendo este achado ainda controverso e sujeito a críticas. A positividade para marcadores neuronais foi observada, neste estudo, em 7 glioblastomas. A expressão destes marcadores em gliomas tem sido relatada, porém de forma inconstante. Hirato, Nakazato e Oga-wa estudaram a expressão de filamentos intermediários não gliais em 24 gliomas, concluindo que estes expressam vários tipos de filamentos intermediários não gliais¹⁴. Em estudos de imuno-histoquímica usando cortes congelados, células positivas para neurofilamento foram detectadas em glioblastomas e astrocitomas anaplásicos¹⁵. Por outro lado, Cosgrove, et al., não observaram a expressão de neurofilamento em nenhum dos casos entre 30 neoplasias astrocíticas incluídas em parafina¹⁶.

Mais recentemente tem sido investigada a positividade para marcadores neuronais em xantastrocitomas pleomórficos e qual o seu papel no diagnóstico diferencial com os glioblastomas de células gigantes¹⁷. Martinez-Diaz, et al. mostraram que os xantastrocitomas pleomórficos e os glioblastomas de células gigantes têm padrões distintos de imuno-reatividade para antígenos neuronais; no entanto, sua série mostra que, embora de fraca intensidade, a positividade para neurofilamento, Neu-N e sinaptofisina foi observada em alguns glioblastomas de células gigantes¹⁸.

No presente estudo, 3 entre os 7 glioblastomas que apresentaram imuno-reatividade para os marcadores neuronais mostravam numerosas células gigantes, porém não foi feita uma avaliação mais detalhada deste aspecto. Embora as características

histológicas dos tumores estudados tenham se mostrado como fator prognóstico independente nesta série, outras variáveis reconhecidamente relacionadas com a sobrevida dos pacientes foram avaliadas.

O tratamento adjuvante (radioterapia e/ou quimioterapia) mostrou ser um fator independente e estatisticamente significativa na sobrevida dos pacientes. O papel da radioterapia como fator determinante de sobrevida prolongada pós-operatória foi relatado por Weir¹⁹. Boiardi et al. mostraram vantagem em tratar pacientes com gliomas anaplásicos com protocolos agressivos combinando radio e quimioterapia, mostrando resposta favorável principalmente nos pacientes com oligodendrogliomas anaplásicos e nos mais jovens²⁰. No presente estudo, 8 pacientes foram submetidos à quimioterapia além da radioterapia. Estudos adicionais são necessários para avaliar o papel das diferentes modalidades de tratamento em cada um dos grupos de tumores, principalmente no que se refere ao efeito do tratamento quimioterápico nos pacientes com GBMo.

Concluimos que o componente oligodendroglial associou-se com maior sobrevida, sendo este resultado estatisticamente significativo. Embora a sobrevida média dos pacientes com GBMn tenha sido maior que a dos pacientes com glioblastomas clássicos, este resultado não foi estatisticamente significativo. Este fato pode estar relacionado ao pequeno número de casos na amostra, sendo o significado da imuno-marcação para antígenos neuronais em gliomas ainda discutido. Será necessária a análise de séries maiores para que o papel do componente neuronal nos glioblastomas possa ser valorizado, o que provavelmente deve ocorrer através de estudos multi-institucionais ou usando casos de registros populacionais de câncer, dada a pouca frequência dos tumores estudados.

Agradecimentos - À Dra C. Dumas Dupont, pela revisão dos casos com divergências de interpretação. Ao Serviço de Neurocirurgia do HUCFF, pela colaboração na obtenção das informações clínicas.

REFERÊNCIAS

1. Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavenee WK. Glioblastoma. In Kleihues P, Cavenee WK (eds). Pathology and genetics: tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000;29-39.
2. Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1987;59:1617-1625.
3. Burger P, Vollmer RT. Histologic factors of prognostic significance in the glioblastoma multiforme. *Cancer* 1980;46:1179-1186.
4. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:215-225.
5. Dumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. Gliomes: classifications de l'OMS et de l'Hôpital Sainte Anne. *Ann Pathol* 2000;20:413-428.
6. Wolf KH, Buslei R, Blümcke I, Wiestler OD, Pietsch T. Neural antigens in oligodendrogliomas and dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Acta Neuropathol* 1997;94:436-443.
7. Wharton SB, Chan KK, Hamilton FA, Anderson JR. Expression of neuronal markers in oligodendrogliomas: an immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24:302-308.
8. Kraus JA, Lamszus K, Glesmann N, et al. Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol* 2001;101:311-320.
9. He J, Mokhtari K, Sanson M, et al. Glioblastomas with an oligodendroglial component: a pathological and molecular study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:863-871.
10. Ino Y, Zlatescu MC, Sasaki H, et al. Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate high grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss. *J Neurosurg* 2000;92:983-990.
11. Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Perl DK. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* 1997;79:1381-1393.
12. Yokoo H, Nobusawa S, Isoda K, et al. Establishment of anti-human Olig2 antibody and successful application to detect human oligodendrocytes and oligodendroglial tumors on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Brain Pathol* 2003; XVth International Congress of Neuro-pathology, Torino-Lingotto, September 14-18:145.
13. Azzarelli B, Miravalle L, Vidal R. Immunolocalization of oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1) in brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:170-179.
14. Hirato J, Nakazato Y, Ogawa A. Expression of non-glial intermediate filament proteins in gliomas. *Clin Neuropathol* 1994;13:1-11.
15. Franke FE, Schachenmayr W, Osborn M, Altmannsberger M. Unexpected immunoreactivities of intermediate filament antibodies in human brain and brain tumors. *Am J Pathol* 1991;139:67-79.
16. Cosgrove M, Fitzgibbons PL, Sherrod A, Chandrasoma PT, Martin SE. Intermediate filament expression in astrocytic neoplasms. *Am J Surg Pathol* 1989;13:141-145.
17. Giannini C, Scheithauer BW, Lopes MBS, Hirose T, Kros JM, Vandenberg SR. Immunophenotype of pleomorphic xanthoastrocytoma. *Am J Surg Pathol* 2002;26:479-485.
18. Martinez-Diaz H, Kleinschmidt-Demasters BK, Powell SZ, Yachinis A. Giant cell glioblastoma and pleomorphic xanthoastrocytoma show different immunohistochemical profiles for neuronal antigens and p53 but shares reactivity for class III β -tubulin. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:1187-1191.
19. Weir B. The relative significance of factors affecting postoperative survival in astrocytomas, grades 3 and 4. *J Neurosurg* 1973;38:448-452.
20. Boiardi A, Silvani A, Pozzi M, Farinotti L, Fariselli GB, Salmaggi A. Advantage of treating anaplastic gliomas with aggressive protocol combining chemotherapy and radiotherapy. *J Neuro-Oncol* 1997;34:179-185.