

PLOIDIA DE DNA EM ASTROCITOMAS

ESTUDO EM 66 PACIENTES BRASILEIROS

*DEBORAH KRUTMAN-ZVEIBIL **, *REINALDO ANDRÉ BRANDT***, *JOÃO GUIDUGLI NETO****

RESUMO - A determinação do conteúdo de DNA nuclear (fração de fase S e ploidia de DNA) foi realizada por meio de análise de imagem em 66 astrocitomas, a partir de material fixado em formalina e seccionado em cortes de 5 micrômetros corados pela técnica de Feulgen. Nossos resultados mostraram forte relação entre a idade do paciente, grau histológico e sobrevida, com a ploidia de DNA e o percentual de células em fase de síntese. A análise da atividade proliferativa de astrocitomas intracranianos é a nosso ver muito útil no entendimento do comportamento biológico, do prognóstico e para o planejamento terapêutico dessas lesões.

PALAVRAS CHAVE: análise de imagem, ploidia de DNA, astrocitoma.

DNA ploidy in glioma: study in 66 Brazilian patients

ABSTRACT - The determination of the nuclear DNA content (S-phase fraction (SPF) and ploidy) was carried out by image analysis (IA). The morphometric and densitometric features of Feulgen-stained nuclei were determined from stored formalin-fixed and paraffin-embedded specimens of 66 patients with intracranial astrocytomas. Our results suggest a strong relationship between patient age, histological grade, survival and DNA ploidy and SPF. The analysis of the proliferative activity of intracranial astrocytomas is very helpful in understanding biological stratification and prognostication to assess tumor behaviour and planning of treatment strategies.

KEY WORDS: image analysis, DNA ploidy, astrocytoma.

Astrocitomas são neoplasias morfológica e biologicamente heterogêneas, derivadas principalmente de astrócitos com graus diferentes de maturação. Os vários tipos de astrocitomas diferem grandemente em sua anatomia macroscópica, histologia e aspectos clínicos. Os astrocitomas de baixo grau correspondem de 25% a 30% de todos os gliomas cerebrais e apresentam-se como tumores de crescimento lento. Por outro lado glioblastomas multiformes são tumores de crescimento rápido.

De acordo com a classificação da OMS, os gliomas são um grupo de tumores neuroepiteliais e podem ser subclassificados em astrocitomas graus I (AGI) e II (AGII) da classificação de Kernohan-Safyre, astrocitoma anáplásico (grau III - AA) e glioblastoma multiforme (grau IV -GBM)¹⁻³.

Caracterizamos neste estudo o conteúdo de DNA nuclear, baseado no índice de DNA (ID), histogramas de ploidia, porcentagem de células em fase de síntese (PFS), percentual de células aneuplóides (PAC) e índice de malignidade (IM) em 66 tumores astrocitários, com a finalidade de determinar a importância destes fatores em relação ao comportamento biológico dessas lesões.

*Patologista do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE); **Neurocirurgião do HIAE; ***Coordenador Serviço de Patologia do HIAE, Professor Titular da Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Aceite: 20-agosto-1999.

MÉTODO

Foram avaliados 66 astrocitomas oriundos dos arquivos de blocos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), de pacientes que deram entrada para tratamento cirúrgico entre 1978 e 1991. Blocos com cerca de 80% de material tumoral foram selecionados.

Os pacientes foram escolhidos entre aqueles de nacionalidade brasileira submetidos a craniotomia no Departamento de Neurocirurgia do HIAE, e com seguimento clínico mínimo de 5 anos, para aqueles ainda vivos até a data de estudo. Todos os pacientes foram tratados com radioterapia complementar.

Diagnóstico histológico

Os espécimes foram estudados histologicamente usando preparados corados pela técnica da hematoxilina - eosina, confeccionados a partir de material fixado em formalina, incluído em parafina, e cortados com espessura de 5 micrômetros. Somente tumores astrocitários foram submetidos ao estudo, usando-se a classificação da OMS para subdividi-los em grupos.

Análise de imagem

Foi realizado estudo citométrico por meio de análise de imagem (AI) usando-se equipamento Kontron-Billdanalysis, equipado com o programa Vidas-DNA. O conteúdo de DNA correlacionou-se à densidade óptica integrada (DOI), medida em cerca de 200 a 300 células selecionadas em cortes de 5 micrômetros corados pela técnica de Feulgen^{4,5}.

A DOI é a quantidade de absorbância que o material expressa como um valor de cinza, tornando possível obter-se um histograma de DNA para cada neoplasia estudada. O ID é expresso como a relação entre a DOI das células neoplásicas e de células normais obtidas do mesmo tecido cerebral. A PFS foi calculada a partir do número de células localizadas entre os picos G0-G1 (pico maior) e G2-M. Para cada caso o coeficiente de variação foi calculado e os valores foram menores que 8,0%, com mediana de 3,10% em nosso material.

O critério utilizado para seleção de núcleos foi o estabelecido por Salmon e col., que corresponde sempre a núcleos bem preservados.

A segmentação foi adotada como satisfatória quando a membrana nuclear estava intacta e não havia artefatos entre células vizinhas.

Os histogramas de DNA foram classificados de acordo com Auer e col. e a convenção de nomenclatura da Sociedade Internacional de Citologia Analítica^{6,7}.

Estudo estatístico

Foi usado o teste de Kaplan-Meyer e o teste exato de Fisher para estatística não paramétrica para comparar-se PFS, ploidia de DNA e IM e PAC com o grau histológico em cada neoplasia. O modelo de regressão de Cox foi utilizado para correlacionar todos os parâmetros com a sobrevida⁸.

Tabela 1. Grau histológico, características clínicas e citométricas.

	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV
Idade	15,9	18,2	41,6	53,6
Hiplóide	50,00%	21,05%	23,08%	5,88%
Diplóide	50,00%	47,37%	30,77%	35,29%
Aneuplóide	0,00%	31,58%	46,15%	58,82%
Índice de DNA	0,834	1,052	1,300	1,200
Células em fase S	8,05%	10,34%	14,23%	17,90%
Células aneuplóides	2,40%	4,48%	22,17%	13,46%
Índice de malignidade	0,042	0,090	0,495	0,306
Sobrevida em semanas	390	341	181	88

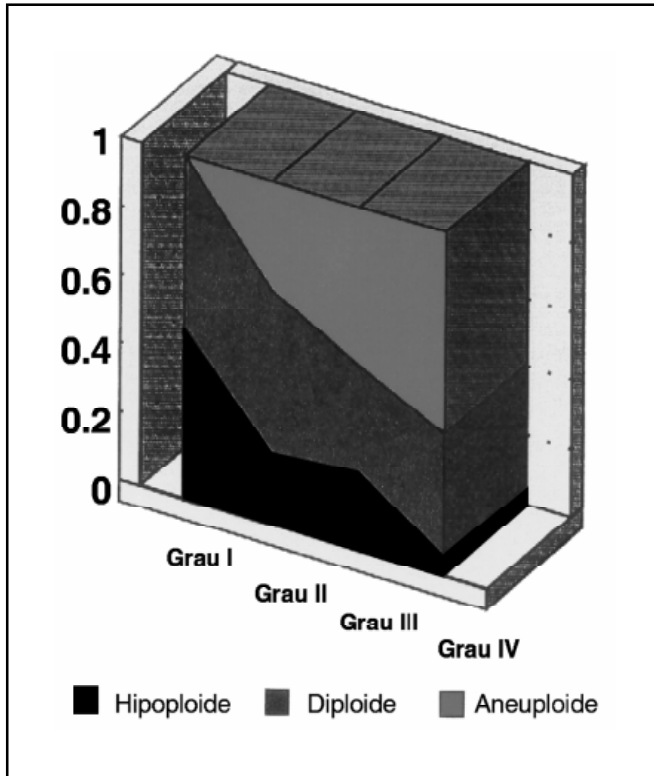


Fig 1. Ploidia e grau histológico.

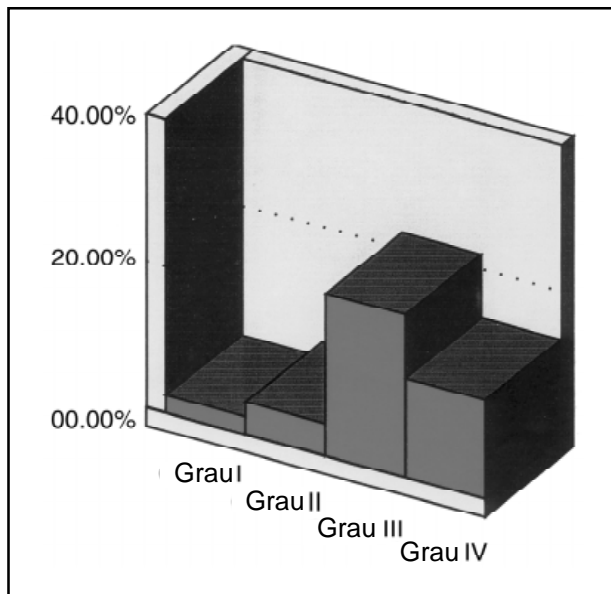


Fig 2. Porcentagem de células aneuploides e grau histológico.

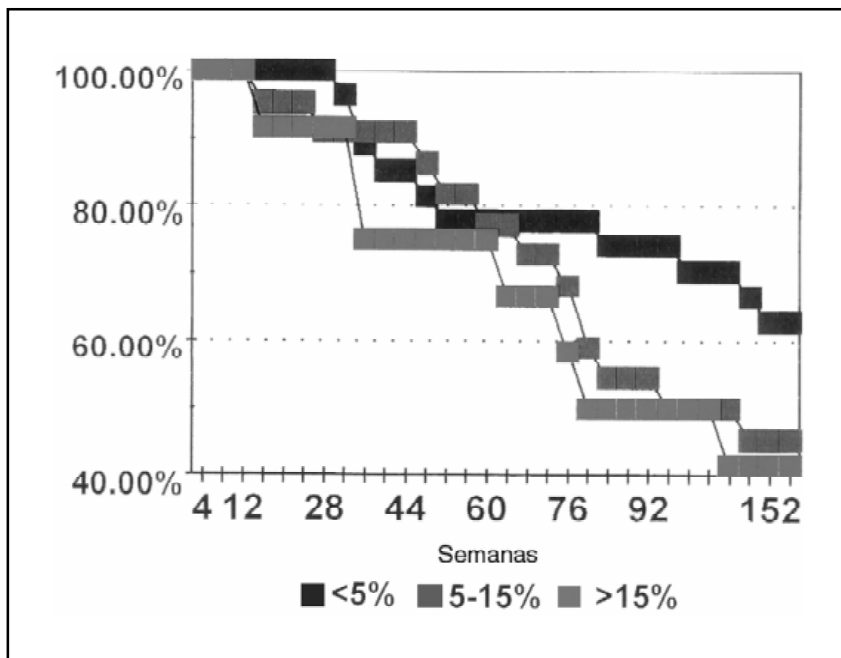


Fig 3. Tempo de sobrevida e percentual de células aneuplóides.

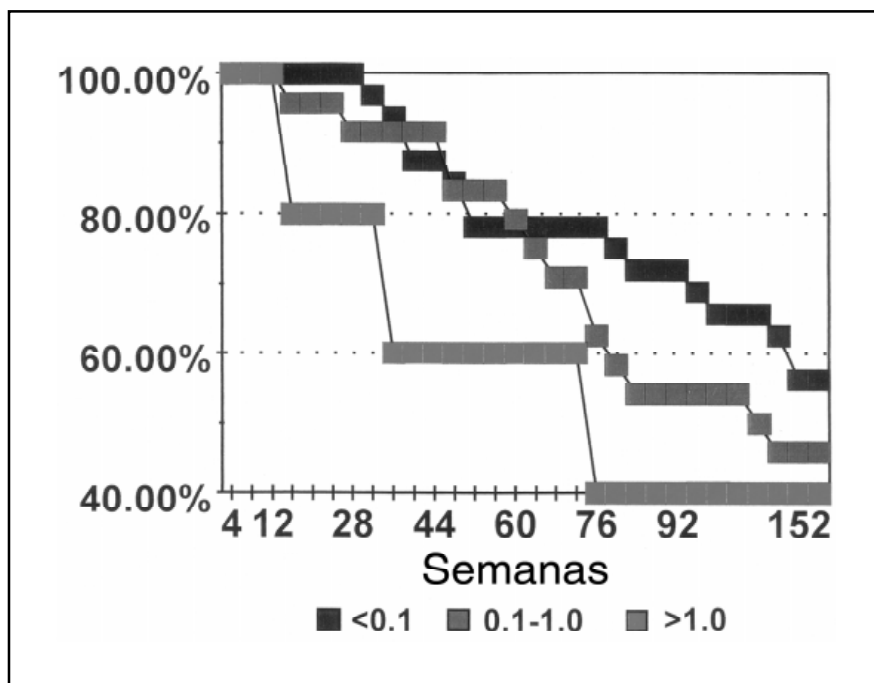


Fig 4. Sobrevida e índice de malignidade.

RESULTADOS

De acordo com a classificação da OMS os tumores foram divididos em 10 AGI, 22 AGII, 16 AA e 18 GBM.

Dos 66 pacientes, 31 eram do sexo masculino e 35 do sexo feminino, com idade variando entre 3 a 68 anos, com mediana de 35 anos.

Verificou-se relação estatisticamente significativa entre cada parâmetro avaliado e a sobrevida dos pacientes.

Em geral, quanto maiores os valores de PFS e PAC, maior o grau histológico, como mostram a Tabela 1 e as Figuras 1 e 2. O mesmo observou-se em relação ao ID e PAC. Os valores medianos dos ID foram, porém, maiores para os AA que para os GBM .

A PFS relacionou-se fortemente com a sobrevida em semanas e os pacientes com mais de 20% de células em fase S tiveram a menor sobrevida, enquanto aqueles com menos de 5% tiveram sobrevida significativamente maior ($p=0,00034$) (Fig 3). Observamos ainda forte relação entre IM e sobrevida como mostrado na Figura 4. Pacientes com IM menor que 0,01 tiveram os melhores tempos de sobrevida. Os demais resultados estão expostos na Tabela 1.

DISCUSSÃO

Do grupo AGI todas as lesões mostraram-se diplóides, sendo 50% delas hipodiplóides. No grupo dos AGII 64,42% dos tumores mostraram-se diplóides, sendo 43,37% hipoplóides e 21,05% diplóides. 31,58% das lesões mostraram-se aneuplóides. Observamos ainda os IM calculados a partir da relação entre o PAC e o número total de células avaliadas. Estes valores foram 0,042; 0,09; 0,495 e 0,306 respectivamente para os gliomas estudados.

Assim como os de outros autores nossos resultados mostram que a maioria dos casos AGI e AGII (astrocitomas bem diferenciados) são diplóides , com baixos ID e PFS, em contraste com os AA e GBM na sua maior parte aneuplóides⁹⁻¹³.

Nossos resultados mostram ainda que os valores de PAC, PFS, IM e ID aumentam com a progressão histológica do tumor. Em análise univariável encontramos forte relação estatística entre idade, grau histológico e sobrevida, o que concorda com achados como os de Salmon e col., Coons e col., Krutman-Zveibil & Brandt e Ullen e col.⁹⁻¹⁴.

Chamou-nos ainda a atenção o fato de que os astrocitomas anaplásicos apresentaram índices levemente maiores que os glioblastomas multiformes, o que ao nosso ver possa estar relacionado ao fato de que a primeira lesão tenha caráter progressivo até o glioblastoma, tendo por esta razão maiores taxas de proliferação e maior instabilidade.

IM, grau histológico, idade e PFS foram os melhores parâmetros prognósticos, correlacionando-se fortemente com a sobrevida dos pacientes ($p<0,001$) .

Muito embora o número de tumores aneuplóides aumente com o grau histológico, a ploidia de DNA não se correlacionou com a sobrevida, já que a maioria dos tumores foram aneuplóides. O mesmo se observou com a PAC.

A idade dos pacientes correlacionou-se fortemente com a sobrevida dos pacientes com astrocitomas. Resultados similares foram obtidos por Coons e col.⁹. Em nosso material obtivemos baixas taxas de sobrevida em pacientes com menos de 50 anos. Observamos ainda que o grau histológico foi maior em pacientes com maior idade..

PFS foi o parâmetro citométrico de maior relação prognóstica . Estudos como os de Sallinen e col.¹⁶, correlacionaram a PFS com a expressão de marcadores como PCNA e Mib-1. Baseados nos nossos achados sobre PFS , assim como Coons e col.⁹, sugerimos dividir os astrocitomas em três

grupos prognósticos, de acordo com PFS alta, média ou baixa. Nós lembramos que os valores numéricos para PFS devem ser adquiridos pelo banco de dados de estudos em cada laboratório. Usando-se o parâmetro fase S baixa, média e alta podemos então dividir o nosso material em astrocitomas de agressividade baixa, intermediária e alta.

Em relação aos nossos valores considerados como pontos de corte obtivemos : valores menores que 5,0%, entre 5 e 20% e maiores que 20,0%, classificados em fases S baixa, média e alta, respectivamente.

De forma semelhante à PFS observamos ainda que os valores de IM nos servem para dividir os astrocitomas em de alta e baixa malignidade, sendo que no nosso material o valor numérico considerado como ponto de corte foi 0,1.

CONCLUSÃO

Concluimos a partir dos nossos achados que os parâmetros citométricos são bem relacionados aos parâmetros clínicos e histológicos na avaliação prognóstica dos astrocitomas, especialmente o PFS e o IM. Sugerimos que tais parâmetros podem ser usados como fatores preditivos na avaliação destes tumores, para cada paciente. Concluimos ainda que nossos dados , colhidos em pacientes brasileiros, são superponíveis àqueles observados por outros autores.

REFERÊNCIAS

1. Rubinstein LJ. A commentary on the proposed revision of the World Health Organization classification of brain tumors for childhood. *Cancer* 1985;56:538-546.
2. Kleihnes P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumors. *Brain Pathol* 1993;3:255-268.
3. Burger PC, Scheithauer BW. Atlas of tumors of the central nervous system. Armed Forces Institute of Pathology, 3rd series, Fasc 10.
4. Feulgen R, Rossembeck H. Mikroskopische Chemisereiner Nucleisaurer vom Typus der Thymonucleisaurer in mikroskopischen Präparaten. *Z Physiol Chem* 1924;135: 203-248.
5. Orfao A, Gonzalez M, Ciudad et al.. Cell cycle and DNA aneuploidy: biological bases and terminology. In Sampedro A, Orfao A. DNA cytometric analysis. Oviedo: Universidad de Oviedo, 1993:13-25.
6. Auer G, Askensten U, Ahrens J. Cytophotometry. *Human Pathol* 1989;20:518-527.
7. Hiddemann WS, Churmann J, Andreff M, et al.. A convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 1984;5:445-446.
8. Siegel S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. São Paulo: McGraw Hill, 1975.
9. Coons SW, Johnson PC, Pearl DK. Prognostic significance of flow cytometry deoxyribonucleic acid analysis of human astrocytomas. *Neurosurgery* 1994;35:119-126.
10. Salmon I, Kiss R. Relationship between histologic grading and DNA ploidy as opposed to survival in 206 astrocytic tumors. *Cancer* 1992;70:538-546.
11. Salmon I, Kiss R. Relationship between proliferative activity and loidy level in a series of 530 human brain tumors , including astrocytomas, meningiomas, schwannomas and metastases. *Human Pathol* 1993;24:329-335.
12. Salmon I, Kruckzynsky A, Caimby I, et al.. DNA histogram typing in a series of 707 tumors of the central and peripheral nervous system. *Am J Surg Pathol* 1994;10:1020-1028.
13. Krutman-Zveibil D, Brandt RA. DNA ploidy in gliomas (Abstract). *Cytometry* 1994; 4(Suppl 4):8.
14. Klucken LH, Dremer NH, Gjersis F. Automated image analysis, histologic grading and survival in patients with astrocytic gliomas: prognostic significance of nuclear count and nuclear area fraction. *Clin Neuropathol* 1984;3:107-112.
15. Danova M, Giaretti W, Merlo F, et al.. Prognostic significance of nuclear DNA content in human neuroepithelial tumors, *Int J Cancer* 1991;48:663-667.
16. Sallinen PK, Haapasalo HK, Visakorpi T, et al.. Prognostication of astrocytoma patient survival by ki-67 (MIB-1), PCNA and S-phase fraction using archived paraffin-embedded samples. *J Pathol* 1994;174:275-282.
17. Ullen H, Falkmer VG, Collins VP, Auer GV. Methodologic aspects of gliomas with astrocytic and/or oligodendrocytic differentiation: correlation of image and flow cytometry studies on paraffin-embedded specimens. *Ann Quant Cytol Histol* 1991;13:168-176.