

ANA SILVIA CARVALHO DE MENEZES BARRETO

**ESTUDO COMPARATIVO HISTOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO
DE TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS DO PLEXO CORÓIDE E DO
PLEXO CORÓIDE FETAL NORMAL.**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de Anatomia Patológica da aluna **Ana Sílvia Carvalho de M. Barreto**.
Campinas, 19 de dezembro de 2001.

Prof. Dr. José Vassallo
Orientador



CAMPINAS

2001

ANA SILVIA CARVALHO DE MENEZES BARRETO

***ESTUDO COMPARATIVO HISTOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO
DE TUMORES BENIGNOS E MALIGNOS DO PLEXO CORÓIDE E DO
PLEXO CORÓIDE FETAL NORMAL.***

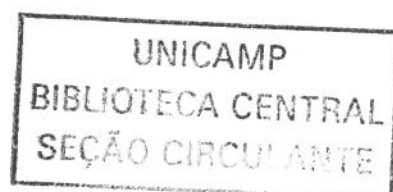
Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ VASSALLO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. LUCIANO DE SOUZA QUEIROZ

CAMPINAS

2001



NIDADE BC
º CHAMADA T/UNICAMP
B275e
EX
TOMBO BCI 50647
PROC 16-837/02
C DX
PREÇO R\$11,00
DATA 06/09/02
Nº CPD

CM00172660-7

LIB ID 255809

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B275e

Barreto, Ana Silvia Carvalho de Menezes

Estudo comparativo histológico e imunoistoquímico de tumores
benignos e malignos do plexo coróide e do plexo coróide fetal normal /
Ana Silvia Carvalho de Menezes Barreto. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : José Vassallo, Luciano de Souza Queiroz
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tumor. 2. Patologia. 3. Sistema Nervoso. I. José Vassallo. II.
Luciano de Souza Queiroz. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. José Vassallo

Membros:

1. Prof. Dr. Fernando M. Cunha
2. Profa. Dra. Eliane M^{te} I. Amstalden
3. Prof. Dr. José Vassallo

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/12/01

DEDICATÓRIA

A Lucas, meu filho

A Gilson, meu marido

A Francisco José e Luis Fernando, meus irmãos

A meus pais e a meus avós, que me ensinaram:

"A PERSEVERENÇA É O CAMINHO PARA A REALIZAÇÃO".

AGRADECIMENTOS

Com grande estima, minha gratidão a todos que, por seu apoio e estímulo, tornaram possível este trabalho, em especial ao Prof. Dr. José Vassallo, meu orientador e Prof. Dr Luciano de Sousa Queiroz, meu co-orientador.

Meus agradecimentos também a Cristiano Aparecido Chagas e Glauce Aparecida Pinto, responsáveis pela realização das reações imunoistoquímicas.

À Maria do Carmo Machado da Silva e Elisabeth Justi Rodrigues pela atenção, amizade e auxílio constantes.

Ao Júlio César Zanardo pela disponibilidade de executar as imagens por computador.

“Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és no mínimo que fazes”.

Fernando Pessoa

	<i>Pág</i>
RESUMO	xiv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Plexo coróide normal. Embriologia, anatomia e histologia.....	17
1.2. Tumores do plexo coróide.....	18
1.3. Estudos imunoistoquímicos do plexo coróide normal e neoplásico.....	21
1.3.1. Plexo normal.....	21
1.3.2. Papilomas e carcinomas do plexo coróide.....	22
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Critérios histológicos analisados.....	32
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	50
7. SUMMARY	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9. APÊNDICE	61

LISTA DE ABREVIATURAS

1A4	Actina muscular lisa
34 β E12	Citoqueratina de alto peso molecular
35 β H11	Citoqueratina de baixo peso molecular (CK8)
a	Apical
AC	Ácinos
AE1 / AE3	Pancitoqueratina
AS	Áreas sólidas
ATT / RT	Tumor atípico teratóide / Tumor rabdóide
BCA	Carcinomas bem diferenciados
c	Citoplasmático
CA	Carcinomas
CAM 5.2	(CK 8, 18)
CC	Células claras
CE	Celularidade
CEA	Antígeno cárcino-embrionário
CK	Citoqueratina
SNC	Sistema nervoso central

CR	Células rabdóides
DE	Desmoplasia estromal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNT	Tumor neuroepitelial disembríoplásico
ECK	Citoqueratina do epitélio estratificado
EMA	Antígeno epitelial de membrana
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HE	Hematoxilina e eosina
IC	Invasão cerebral
IOCK	Citoqueratina de epitélio simples
LP34	Citoqueratina
lu-5	Citoqueratina
M	Mitose
m	Membrana
n	Nuclear
NE	Necrose
NF	Neurofilamento
NSE	Enolase neuronal específica
OMS	Organização Mundial da Saúde

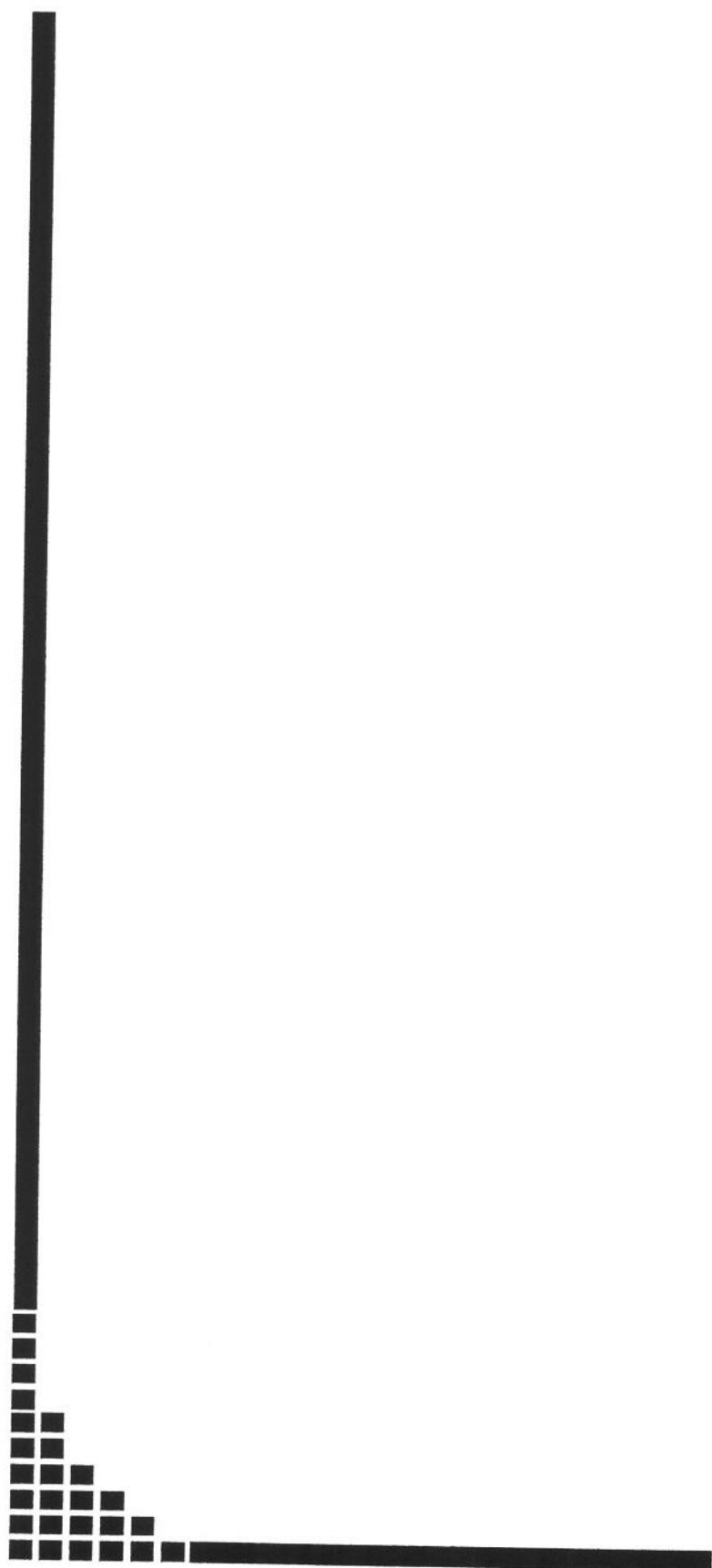
p53	Proteína (p53)
PA	Papilas
PCA	Carcinomas pouco diferenciados
PCFN	Plexo coróide fetal normal
PGNT	Tumor papilífero glio-neuronal
PL	Pleomorfismo celular
PNET	Tumor neuroectodérmico primitivo
PP	Papiloma do plexo coróide
PV	Proliferação vascular endotelial
PXA	Xantoastrocitoma pleomórfico
R	Pseudo-rosetas peri-vasculares
RT	Tumor rabdóide
S100	Proteína (S100)
SNF	Sinaptofisina
SV-40	Simian vírus 40
TPC	Tumores do plexo coróide
TTR	Transtiretina
VIM	Vimentina

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Anticorpos utilizados no presente estudo.....	31
TABELA 2 : Dados de idade, sexo e localização dos tumores estudados.....	34
TABELA 3 : Achados histológicos em tumores do plexo coróide e no plexo coróide fetal normal.....	39
TABELA 4 : Achados imunoistoquímicos em tumores do plexo coróide e plexo coróide fetal normal.....	43

	<i>Pág</i>
FIGURAS 1 A 6 Aspectos histológicos em carcinomas do plexo coróide.....	38
FIGURA 1 : pseudorosetas perivasculares. HE, 100x.....	38
FIGURA 2 : proliferação vascular endotelial. HE, 400x.....	38
FIGURA 3 : desmoplasia. HE, 100x.....	38
FIGURA 4 : área com células rabdóides. HE, 400x.....	38
FIGURA 5 : alta celularidade. HE, 400x.....	38
FIGURA 6 : área com células claras. HE, 400x.....	38
FIGURAS 7 A 9 Aspectos imunoistoquímicos em:	40
FIGURA 7 : plexo coróide fetal normal. GFAP, 100x.....	40
FIGURA 8 : papiloma do plexo coróide. Vimentina, 100x.....	40
FIGURA 9 : papiloma do plexo coróide. Laminina, 100x.....	40
FIGURAS 10 A 12 Aspectos imunoistoquímicos em:.....	41
FIGURA 10 : carcinoma bem diferenciado do plexo coróide. S-100, 400x.....	41
FIGURA 11 : carcinoma bem diferenciado do plexo coróide. Laminina, 400x.....	41

FIGURA 12 :	carcinoma pouco diferenciado do plexo coróide. AE1/AE3, 400x.....	41
FIGURAS 13 A 14	Aspectos imunoistoquímicos em:	42
FIGURA 13 :	carcinoma pouco diferenciado do plexo coróide. Sinaptofisina, 400x.....	42
FIGURA 14 :	carcinoma pouco diferenciado do plexo coróide. 1A4, 400x.....	42



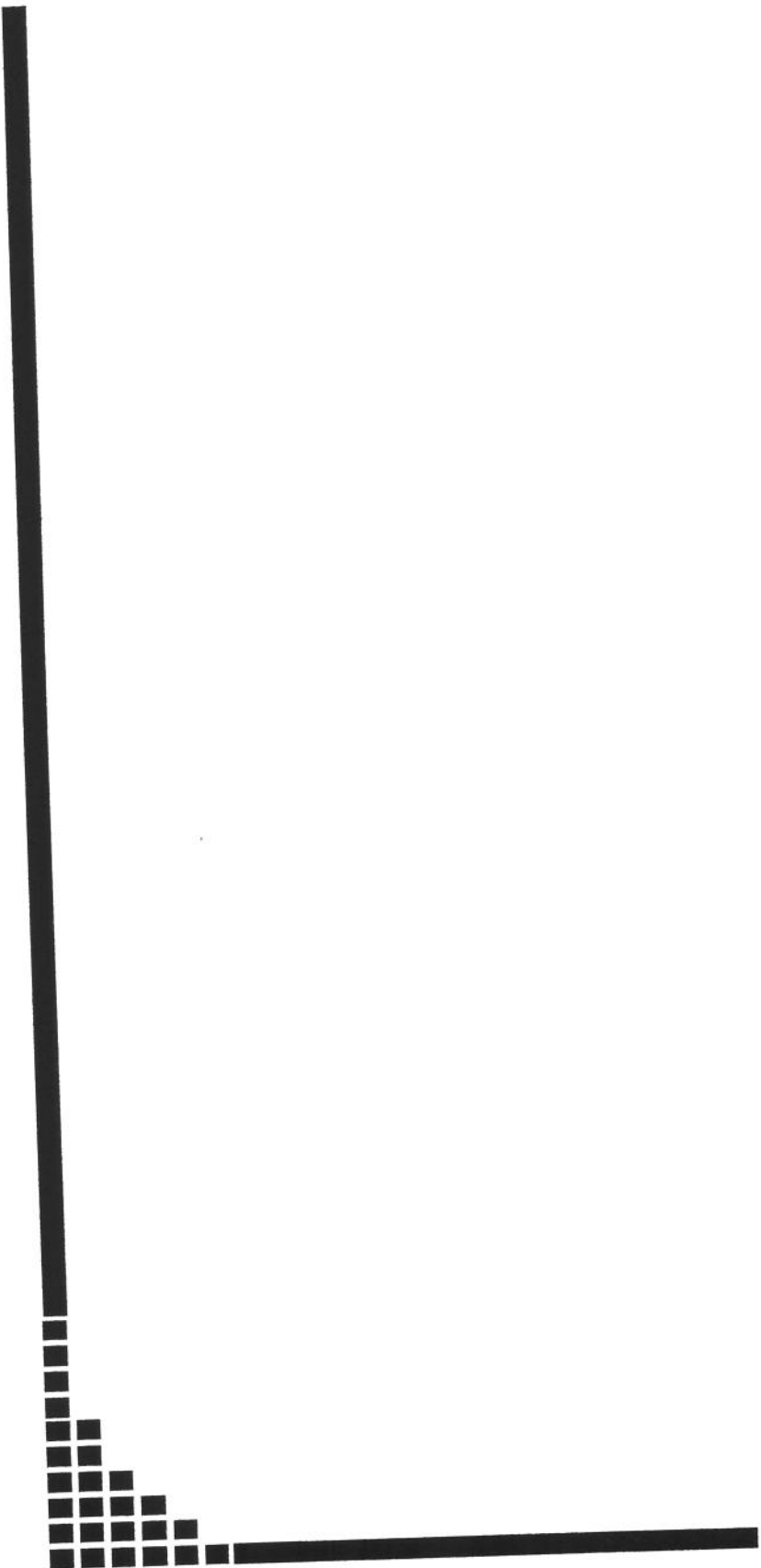
RESUMO

INTRODUÇÃO: os tumores do plexo coróide (TPC) são raros. A literatura mostra grande variação na reatividade imunoistoquímica de diversos marcadores. Os resultados são controversos, mesmo em relação ao perfil imunoistoquímico do plexo coróide.

OBJETIVOS: estudar o padrão imunoistoquímico dos TPC para obter dados úteis no diagnóstico diferencial de tumores anaplásicos; comparar os achados com o perfil imunoistoquímico de plexos coróides fetais normais (PCFN) e avaliar se durante o processo de transformação neoplásica as células readquirem características fetais.

MATERIAL E MÉTODOS: 13 TPC foram diagnosticados entre 1966 e 1999 em pacientes até 25 anos: 5 papilomas (PP), 2 carcinomas bem diferenciados (BCA), 6 carcinomas pouco diferenciados (PCA) e 5 plexos coróides fetais normais (PCFN). Estes foram submetidos a estudo imunoistoquímico em cortes parafinados, utilizando-se um painel incluindo marcadores epiteliais, neuronais e mesenquimais.

RESULTADOS / CONCLUSÕES: a pancitoqueratina AE1 / AE3 foi fortemente positiva em todos 13 casos, inclusive nas áreas pouco diferenciadas dos PCA, onde a reatividade foi focal em 3 e difusa em 3 casos. Em contraste com a literatura, citoqueratina de baixo peso molecular (35 β H11) não foi expressa em nenhum dos 8 casos de carcinoma, mas esteve presente nos 5 PP. Em 4/6 PCA houve imuno-reatividade para actina de músculo liso (1A4) em 10 a 30% das células. Isto foi verdadeiro também para um caso onde não havia células do tipo rabdóide. Em contraste com a literatura, a laminina não foi de ajuda no diagnóstico dos PCA, pois não foi detectada nos 6 casos. Em todos os PCFN houve positividade para GFAP e negatividade para 35 β H11. A reação imunohistoquímica para 35 β H11 nos casos de PCFN assemelhou-se aos resultados dos 8 casos de carcinoma e diferiu dos 5 PP. Este fato pode indicar que durante a transformação maligna as células neoplásicas readquirem alguns marcadores imunoistoquímicos presentes nas células fetais.



1. INTRODUÇÃO

1.1. PLEXO CORÓIDE NORMAL. EMBRIOLOGIA, ANATOMIA E HISTOLOGIA

O plexo coróide distribui-se na porção mediana do corpo dos ventrículos laterais, nos cornos posterior e inferior, mas não nos cornos frontais. Ocupa também o teto do terceiro e do quarto ventrículos. É constituído por monocamada de células especializadas para secretar o líquido cefalorraquiano, dispostas sobre eixo conjuntivo-vascular em delicadas formações papilíferas.

A formação do plexo coróide inicia-se na sexta semana gestacional na porção inferior do mielencéfalo e na oitava semana no teto do diencefalo. Nestas localizações específicas do tubo neural, conhecidas como tela coroidéia, o neuroepitélio permanece fino com camada única de células em aposição ao mesênquima primitivo. A seguir, os vasos do mesênquima invaginam-se e delimitam a estrutura papilar do plexo coróide. A tela coróide do mielencéfalo origina o plexo coróide do IV ventrículo e a do teto diencefálico o plexo do III ventrículo e dos ventrículos laterais, que se desenvolvem em continuidade através do forame de Monro. O plexo coróide dos ventrículos laterais desenha um arco no corpo, trigono e corno temporal, neste último situado ao longo da fissura coróide.

A camada de células que reveste a tela coróide está em continuidade com as células que recobrem os ventrículos e o canal central da medula espinhal, ambas originadas do neuroepitélio da placa neural.

As células do revestimento ventricular diferenciam-se em células endimárias apenas entre a 24ª e a 28ª semanas gestacionais (STAUDT et al., 1977). Bem antes, por volta da 8ª semana, as células da tela coróide já se especializaram no epitélio de revestimento do plexo coróide, provavelmente através de fatores químicos secretados pelo mesênquima invaginado (TARATUTO et al., 1983; CATALA, 1998). Por volta da 11ª semana as células de revestimento do plexo coróide são colunares e possuem grande quantidade de glicogênio citoplasmático conferindo-lhes aspecto claro e vacuolado. O estroma é frouxo e rico em mucina. Entre as 15ª e 17ª semanas o epitélio transforma-se de colunar a cubóide e fibras colágenas aparecem no estroma. Até o nascimento as células cubóides se retraem e perdem o glicogênio intra-citoplasmático, que não mais reaparece no epitélio coróide normal do adulto.

A produção líquórica pelo plexo coróide inicia-se a partir da 24ª semana gestacional (KASPER et al., 1986).

As características epiteliais das células do plexo coróide são evidentes à microscopia óptica e corroboradas por microscopia eletrônica e imunoistoquímica. À microscopia eletrônica, notam-se microvilos longos e grossos na face apical e membrana basal contínua e fenestrada caracterizando um epitélio envolvido em mecanismos secretores e absorptivos. As células do plexo são cubóides, polarizadas e as junções intercelulares laterais, próximas ao lúmen, são complexas do tipo selado ("tight junctions"). Transitoriamente no seu desenvolvimento o plexo coróide é ciliado; no adulto, raras células apresentam cílios com microtúbulos de configuração $(9 \times 2 + 2)$, ou seja, 9 microtúbulos duplos periféricos e 2 microtúbulos centrais (MATSUSHIMA, 1983). O eixo conjuntivo-vascular contém fibras colágenas, elásticas e vasos com fenestração endotelial.

Imunoistoquimicamente, as células expressam citoqueratinas de epitélio simples (CK 8,18) mesmo em estágios precoces do desenvolvimento, anteriores à produção líquórica.

1.2. TUMORES DO PLEXO CORÓIDE

As neoplasias originadas do plexo coróide são raras, correspondendo a 0,4 a 1 % dos tumores cerebrais (PIANETTI et al., 1998; PENCALET et al., 1998). Os tumores do plexo predominam na população pediátrica, especialmente nos dois primeiros anos de vida. A incidência na faixa etária de 0 a 15 anos sobe para 1,5 a 4% (NAKASHIMA et al., 1982; RICKERT, 2001). Seu comportamento biológico abrange amplo espectro, indo de tumores benignos (papilomas do plexo coróide) a altamente anaplásicos e invasivos (carcinomas).

O primeiro caso de papiloma do plexo coróide foi descrito em 1833 por GUERARD (apud RAIMONDI et al., 1975), mas apenas em 1960 uma série extensa de tumores do plexo coróide foi publicada por MATSON e CROFTON.

Segundo a nova classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (1993), os tumores do plexo compreendem duas categorias:

- 1- PAPILOMAS (GRAU I)
- 2- CARCINOMAS DO PLEXO CORÓIDE (GRAU III)

Os papilomas do plexo coróide são os mais freqüentes (60 a 80%) e reproduzem a arquitetura do plexo normal. Na literatura existe leve predominância masculina e não há preferência racial, étnica ou geográfica. Mais recentemente a infecção pelo papova vírus SV-40 (simian vírus 40, pequeno vírus de primatas de cadeia DNA) tem sido relacionada à etiologia dos tumores do plexo coróide. Relata-se associação entre as síndromes de Li-Fraumeni e de Aicardi com tumores do plexo coróide (BERGSAGEL, 1992; ROBINOW, 1984; YUASA, 1993).

Clinicamente, hipertensão intracraniana e hidrocefalia são as apresentações mais freqüentes dos tumores do plexo, secundárias à hiperprodução do líquido pelas células tumorais bem diferenciadas e/ou hidrocefalia obstrutiva e/ou diminuição da reabsorção nas granulações aracnóideas por depósitos de fibrina, material proteico e resíduos tumorais.

Disseminação por via líquórica pode ocorrer nas neoplasias benignas e malignas, mas é excepcional nas primeiras.

As localizações mais freqüentes em crianças são ventrículo lateral (43%), quarto ventrículo (39%), terceiro ventrículo (10%) e ângulo ponto-cerebelar (9%) (PIANETTI et al., 1998). Nos adultos, o quarto ventrículo é o sítio mais comum. RUSSELL & RUBINSTEIN (1989) demonstraram predileção à esquerda para tumores situados nos ventrículos laterais.

A excisão cirúrgica radical é o tratamento de escolha, sendo a quimioterapia adjuvante reservada para pacientes com ressecção subtotal ou disseminação líquórica. A radioterapia complementar pode reduzir o risco de recorrências, mas só é indicada em crianças maiores de três anos (PENCALET et al., 1998).

Atualmente, a sobrevida de 5 anos é de 100% para os papilomas e 26 a 40% para os carcinomas (RICKERT et al., 2001).

O aspecto macroscópico dos papilomas assemelha-se a couve-flor, de superfície globular irregular e áreas focais de hemorragia e calcificação. Seu crescimento é expansivo, preenchendo o ventrículo e não invadindo o epêndima e tecido cerebral adjacentes.

Microscopicamente, as papilas reproduzem a arquitetura do plexo coróide normal, sendo revestidas por epitélio colunar, cúbico ou pseudo-estratificado, apoiado em membrana basal contínua, íntegra e tecido conjuntivo fibrovascular. Em relação ao plexo coróide normal, as formações papilíferas dos papilomas são em maior número, e as células de revestimento são mais planas na sua superfície apical. As células do plexo coróide normal são mais cúbicas que colunares, e sua superfície apical é cupuliforme, lembrando pedras de calçamento (*cobblestones*).

Algumas variantes de papilomas foram descritas, dentre elas, formas acinares, císticas, tubulares, pigmentadas, muco-secretoras e oncocíticas.

A ocorrência de figuras de mitose em papilomas sugere comportamento mais agressivo, com recorrências. Transformação maligna é descrita em menos de 20% dos casos (CHOW et al., 1999).

Os carcinomas do plexo são neoplasias com características malignas inequívocas, notando-se atipias citológicas, necrose, atividade mitótica, invasão cerebral e perda da arquitetura papilífera.

Existem casos, no entanto, em que a distinção entre papiloma e carcinoma do plexo coróide não é tão simples como proposta pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a denominação de papiloma atípico é utilizada. Nestes exemplos, encontramos aspectos celulares de benignidade e preservação da arquitetura papilífera. No entanto, existe microinvasão focal do tecido cerebral, associada a perda da arquitetura vilosa no local de invasão. Apesar disso, estes tumores apresentam curso clínico favorável, sem recidivas locais pós-ressecção total, sendo desnecessário tratamento quimioterápico ou radioterápico (LEVY, 2001).

Para RUSSELL & RUBINSTEIN (1989), as atipias citológicas e invasão cerebral são os critérios que mais devem ser valorizados para o diagnóstico de malignidade. ZÜLCH (1986) considera que um tumor seja carcinoma quando há alterações anaplásicas, independente de invasão cerebral.

Nos casos de anaplasia acentuada e perda da arquitetura papilífera impõe-se o diagnóstico diferencial com metástases (em adultos), e ependimomas anaplásicos, meduloblastomas, tumor teratóide atípico / tumor rabdóide e tumor neuroectodérmico primitivo (PNET) (em crianças).

1.3. ESTUDOS IMUNOISTOQUÍMICOS DO PLEXO CORÓIDE NORMAL E NEOPLÁSICO

Abaixo resumiremos resultados imunoistoquímicos obtidos em diferentes relatos na literatura referentes a papilomas, carcinomas e plexo coróide normal.

1.3.1. Plexo normal

REFERÊNCIA	MARCADORES
KASPER et al., 1986	Todos os 6 adultos e 1 feto (20 semanas) mostraram imuno-reatividade para vimentina, citoqueratinas 8 e 18, neurofilamentos e laminina. GFAP e desmina foram sempre negativos.
MIETTINEN et al., 1986	1 adulto e 7 ratos: todos imuno-reagiram para citoqueratinas 8, 18 e 19 e foram negativos para vimentina e GFAP.
DOGLIONI et al., 1987	5 adultos: todos com imuno-reatividade para vimentina, citoqueratinas 8, 18 e 19, proteína S100 e EMA. Negativos para GFAP.

FELIX et al., 1987	4 casos sem idade especificada: reativos para citoqueratina de epitélio simples (IOCK) e proteína S100. Negativos para citoqueratinas de epitélio estratificado (ECK), GFAP, CEA e alfa-fetoproteína.
KOUNO et al., 1988	2 adultos: reativos para citoqueratinas 8 e 18 e negativos para GFAP.
CRUZ-SANCHES et al., 1989	2 fetos de 29 e 33 semanas gestacionais: negativos para vimentina, GFAP, LP 34, CAM 5.2, S100, EMA. 2 recém-nascidos: dos anticorpos acima testados foram reativos para vimentina e S100 e negativos para os demais. 3 adultos: reativos para vimentina, GFAP e S100 e negativos para os demais.
SARNAT, 1992	1 feto: reativo para vimentina, citoqueratina e S100.

Nota: De todos os trabalhos acima, apenas os 3 adultos estudados por Cruz-Sanches apresentaram reatividade para GFAP.

1.3.2. Papilomas e carcinomas do plexo coróide

REFERÊNCIA	MARCADORES
RUBINSTEIN & BRUCHER, 1981	22 papilomas: 9 reativos para GFAP.
TARATUTO et al., 1983	19 papilomas e 13 carcinomas: reativos para GFAP em 9 e 2 respectivamente.
MIETTINEN et al., 1986	4 papilomas: 2 foram imuno-reativos para vimentina, 1 para GFAP e 3 para citoqueratina 8,18 2 carcinomas: 1 foi reativo para vimentina, GFAP e ambos para citoqueratina 8,18.

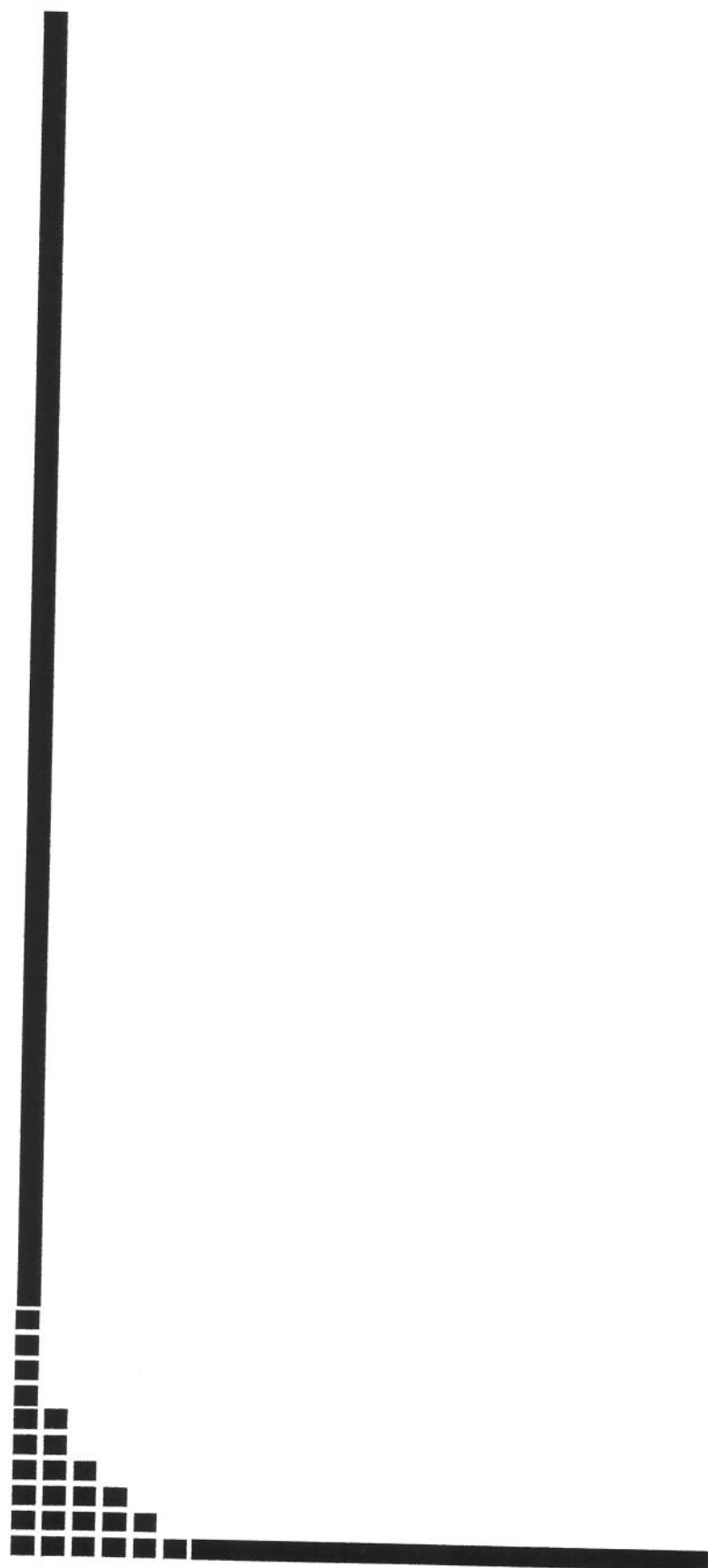
DOGLIONI et al., 1987	16 tumores do plexo: 15 reativos para S100, 14 reativos para citoqueratina de epitélio simples e vimentina, 7 para GFAP, 14 para antígeno pan-epitelial (lu-5) e 11 para EMA
FELIX et al., 1987	17 papilomas: 6 reativos para GFAP, 17 para citoqueratinas de epitélio simples (IOCK) e S100. Todos foram negativos para citoqueratinas de epitélio estratificado (ECK), CEA e alfa-fetoproteína. 7 carcinomas: 1 reativo para GFAP, 7 para IOCK, 4 para S100 e 1 para CEA. Todos foram negativos para ECK e alfa-fetoproteína.
KOUNO et al., 1988	5 papilomas: 5 reativos para citoqueratinas 8, 18 e 2 para GFAP.
MANNOJI et al., 1988	11 papilomas: 6 reativos para GFAP e 11 para pancitoqueratinas (AE1/AE3). 4 carcinomas: 1 reativo para GFAP e 4 para AE1/AE3.
CRUZ-SANCHES et al., 1989	11 papilomas: 11 reativos para vimentina e S100, 9 para GFAP e 8 para CAM 5.2. Todos foram negativos para desmina, EMA e LP 34. 5 carcinomas: 5 imuno-reativos para vimentina, 4 para CAM 5.2 e LP 34, S100 e EMA, 3 para GFAP. Todos foram negativos para desmina.
ANG et al., 1990	5 papilomas: 5 reativos para pancitoqueratinas, 4 para S100 e TTR, 2 para GFAP, 1 para vimentina. Todos negativos para CEA. 1 carcinoma positivo para GFAP, AE1/AE3 e S100 e negativo para vimentina, TTR e CEA.

FURNESS et al., 1990	2 papilomas: Todos reativos para GFAP, CAM 5.2 e laminina e negativos para CEA. 4 carcinomas: 4 reativos para CAM 5.2, 3 para GFAP focalmente e laminina fragmentada em todos os casos. CEA negativos em todos.
HERBERT et al., 1990	6 papilomas: todos reativos para TTR. 3 carcinomas: todos reativos para TTR.
GOTTSCHALK et al., 1993 (revisão de dados da literatura)	Tumores do plexo coróide: vimentina 16-88%, GFAP 22-85%, CK 8,18,19 83-100%, NSE 20-100%, S100 40-94%, EMA 69-71%, TTR 67-100%, CEA 0-50%
RADOTRA et al., 1994	12 tumores do plexo (9 papilomas e 3 carcinomas): todos positivos para S100 e NSE, 11 para GFAP, 7 para vimentina, 3 EMA e 2 para AE1/AE3.
NEWBOULD et al., 1995	17 carcinomas: 17 reativos para TTR, 16 reativos para vimentina e S100, 14 para EMA, 12 para CAM 5.2, 4 para GFAP, 3 para CEA.
MUTHUPHEI, 1995	5 papilomas: todos reativos para vimentina e S100, 4 para GFAP e AE1/AE3.
GYURE et al., 2000	35 papilomas (31 papilomas, 4 atípicos): 24 reativos para GFAP, 19 para S100, 31 para TTR, 4 para EMA. Para diferentes queratinas: CK 7, 28 reativos; CK 3, 3 reativos; AE1/AE3, 27 reativos; CAM 5.2, 33 reativos

Em resumo, a maioria dos estudos de tumores do plexo coróide demonstram reatividade para citoqueratinas, especialmente de baixo peso molecular (CK 8, 18), vimentina, antígeno específico de membrana (EMA), transtiretina (TTR), proteína S100, proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e NSE. No entanto, existe grande variação na frequência destes achados entre os autores, muitas vezes sem chegar a um consenso.

Nos estudos referentes a plexos de adultos e fetos há unanimidade quanto à negatividade para GFAP. A única exceção foi o trabalho de Cruz-Sanches et al. (1989) em plexo coróide normal de três adultos.

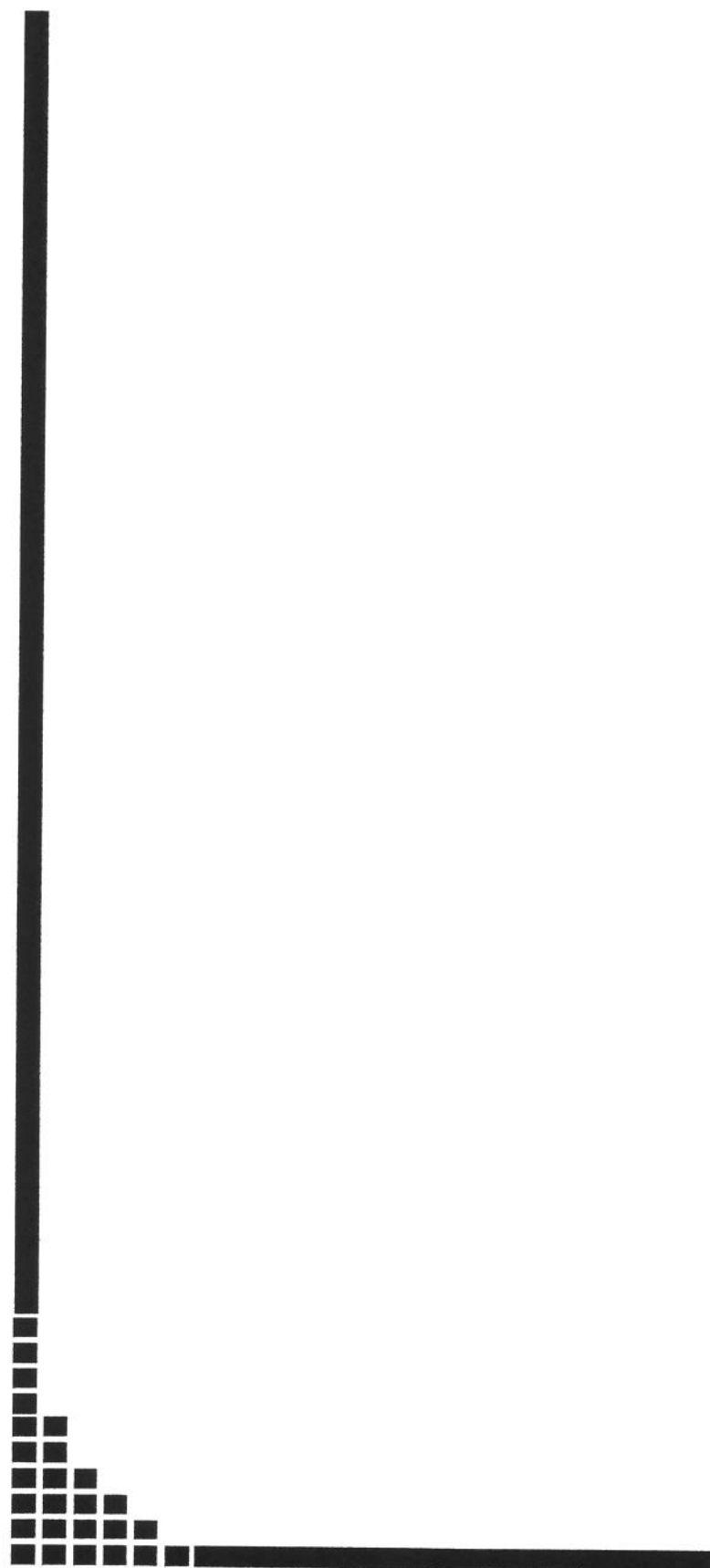
Dada a raridade desta neoplasia e a diversidade dos painéis imunoistoquímicos e dos perfis apresentados na literatura, tanto das neoplasias do plexo coróide, quanto dos plexos coróides normais, propusemo-nos a estudá-los no presente trabalho.



2. OBJETIVOS

Neste trabalho estudamos as neoplasias do plexo coróide, objetivando:

1. Comparar aspectos histológicos e imunoistoquímicos do plexo coróide fetal normal com tumores do plexo coróide para avaliar se durante o processo de transformação tumoral as células neoplásicas readquirem características imaturas.
2. Estabelecer o padrão de reatividade nos papilomas e carcinomas bem e pouco diferenciados do plexo coróide, através de um painel imunoistoquímico com marcadores epiteliais, neuronais e estromais.



3. MATERIAL E MÉTODOS

Casos de tumores do plexo coróide, em pacientes de até 25 anos de idade, entre 1966 e 1999, foram selecionados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Dados de identificação, idade, sexo e localização dos tumores foram anotados.

Apenas casos que apresentavam material arbitrado como suficiente (pelo menos 1,5 cm no maior diâmetro), incluídos em parafina e disponíveis para estudo imunoistoquímico foram incluídos no estudo. Algumas lâminas, principalmente as mais antigas, apresentavam artefatos técnicos, tendo sido reprocessadas e recoradas com HE. Novos cortes dos blocos foram realizados para o estudo imunoistoquímico.

Para selecionar os 13 casos de tumores do plexo coróide, todos os casos de tumores neuroepiteliais do sistema nervoso central do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP entre 1966 a 1999, na faixa etária de 0 - 25 anos, foram reclassificados conforme a nomenclatura da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 1993 (KLEIHUES et al., 1993b). As categorias dos 184 casos examinados estão discriminadas a seguir: tumores astrocitários: astrocitomas difusos 29, astrocitomas pilocíticos 38, xantoastrocitomas pleomórficos 3; tumores ependimários 32; tumores do plexo coróide 13; tumores neuronais e neurogliais mistos: gangliogliomas 15; tumores do parênquima da pineal: pineoblastomas 2; tumores embrionários: meduloblastomas 39; paraganglioma: 1 caso; tumor atípico teratóide / tumor rabdóide 2 casos (entidade não incluída na classificação da OMS), e 10 casos de meningioma.

As lâminas coradas em HE foram revistas por dois neuropatologistas independentes e os diagnósticos, baseados em critérios histo-morfológicos e dados clínicos, confrontados.

Os 13 casos de tumores do plexo coróide foram classificados como papilomas (PP) e carcinomas (CA); os carcinomas foram subdivididos em bem (BCA) e pouco diferenciados (PCA). Na literatura não se estabelece o número de critérios necessários para o diagnóstico de malignidade, mas nos nossos casos pelo menos 4 dos 6 critérios seguintes estavam presentes: alta celularidade, perda da arquitetura papilífera, pleomorfismo celular

(hipercromasia, variações da forma e tamanho nuclear e multinucleações), mitoses típicas ou atípicas, áreas de necrose e invasão cerebral. Os carcinomas pouco diferenciados (PCA) apresentavam padrão sólido exclusivo ou predominante, destituído de fundo fibrilar. Na classificação da OMS o papiloma atípico não é reconhecido, provavelmente por apresentar prognóstico semelhante às variantes benignas. Neste estudo, o único caso considerado como papiloma atípico foi incluído entre os papilomas.

O material estudado consistiu de:

PLEXO CORÓIDE NORMAL DE FETOS	5 CASOS
PAPILOMAS DO PLEXO CORÓIDE	5 CASOS
CARCINOMAS BEM DIFERENCIADOS DO PLEXO CORÓIDE	2 CASOS
CARCINOMAS POUCO DIFERENCIADOS DO PLEXO CORÓIDE	6 CASOS

Os plexos fetais foram retirados dos ventrículos laterais e as idades gestacionais foram 16 (2 casos), 28 (2 casos) e 40 semanas (1 caso).

Os cortes histológicos dos 13 tumores do plexo coróide e dos 5 plexos coróides fetais foram colhidos em lâminas silanizadas e submetidas ao procedimento imunoistoquímico. Os cortes foram desparafinados e hidratados. A recuperação antigênica utilizou o método do calor úmido, imergindo-se as lâminas com os cortes em citrato tamponado, pH 6.0, 10mM, por 25 minutos em panela a vapor (100°C). Os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primários a 4°C durante a noite (ver Tabela 1), todos provenientes da Dakopatts. A revelação da reação deu-se através do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Dakopatts, Dinamarca), corado por 3,3 diaminobenzidina e contra-corado com hematoxilina.

TABELA 1 - ANTICORPOS UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO

ANTICORPOS	DILUIÇÃO
Citoqueratina, AE1/AE3	1:50
Citoqueratina, 35 β H11	1:50
Citoqueratina, 34 β E12	1:50
Antígeno epitelial de membrana (EMA)	1:80
Antígeno cárcino-embrionário policlonal (CEA)	1:1000
Vimentina, V9	1:100
Proteína S100	1:1000
Neurofilamento	1:200
Sinaptofisina	1:50
Enolase específica neuronal monoclonal (NSE)	1:100
Proteína glial fibrilar ácida	1:100
Proteína transtiretina (TTR)	1:100
Desmina, D33	1:20
Actina muscular lisa, 1A4	1:25
Laminina	1:1000
Proteína p53	1:100

Os casos foram considerados positivos quando pelo menos 10% das células demonstraram a coloração acastanhada característica, de padrão nuclear, citoplasmático ou membrana, conforme cada anticorpo utilizado. A frequência de imunorreatividade de cada antígeno foi avaliada para cada grupo de tumores e para o plexo coróide fetal normal. A graduação semi-quantitativa imunoistoquímica foi feita da seguinte forma:

INTENSIDADE	EXTENSÃO	PADRÃO
0 (negativa)	0 (negativa)	c (citoplasmático)
1 (fraca)	1 (focal, esparso)	m (membrana)
2 (moderada)	2 (até 1/3)	n (nuclear)
3 (intensa)	3 (1/3-2/3)	a (apical)
	4 (2/3-3/3)	

3.1. CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS ANALISADOS

- **GRADUAÇÃO DA CELULARIDADE**

(CE):1 (leve = apenas papilas), 2 (moderada = papilas em mais de 50% do material e/ou mais de uma camada de células no revestimento das papilas), 3 (intensa = áreas sólidas em mais de 50% do material)

- **GRADUAÇÃO DAS MITOSES**

(M): 0; 1(1/10 Campos de maior aumento [CMA]);

2 (2/10 CMA); 3 (3 ou mais/10 CMA)

- **INVASÃO CEREBRAL**

(IC): presente/ausente.

- **GRADUAÇÃO DOS DEMAIS CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS**

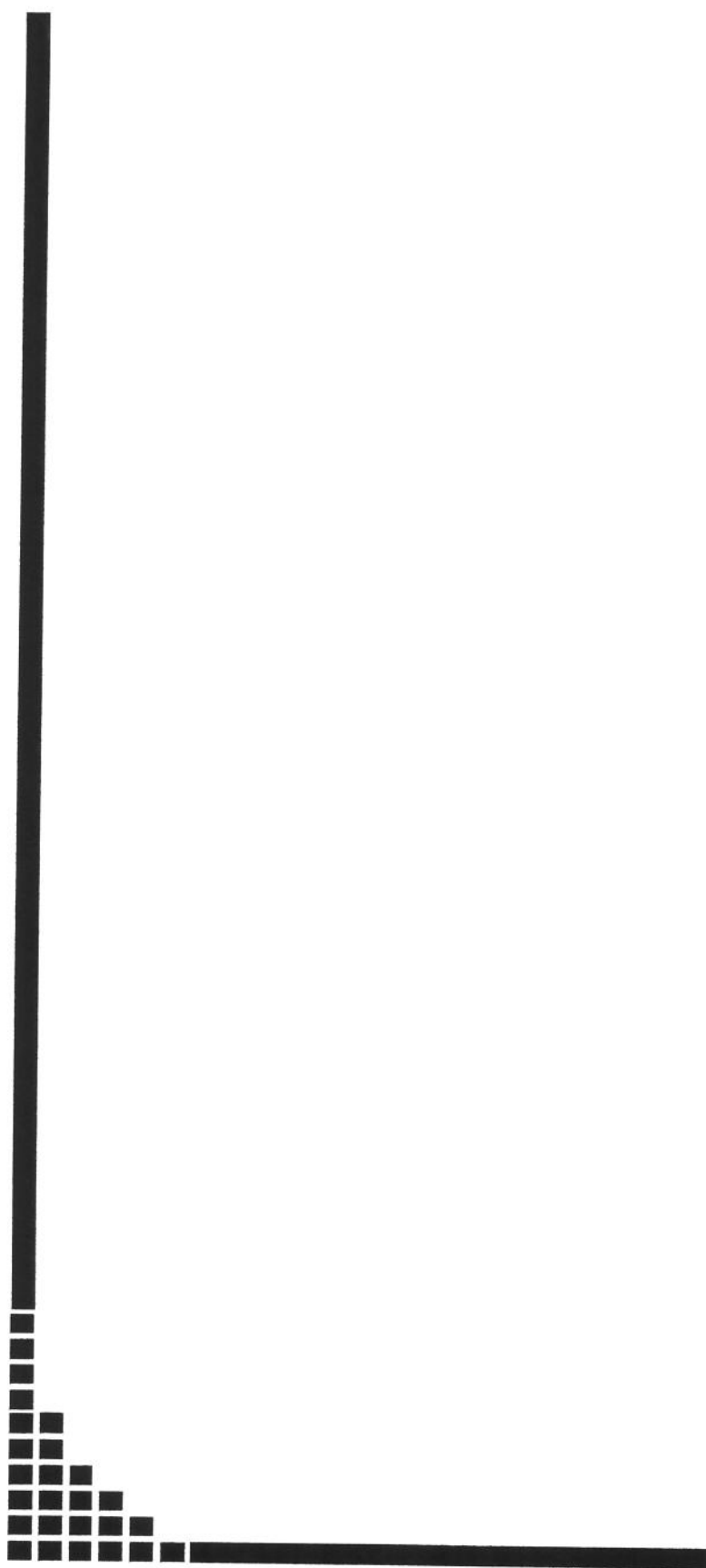
0;

1 (focal);

2 (moderada);

3 (frequente);

Papilas (PA); Ácinos (AC); Áreas sólidas (AS); Proliferação vascular endotelial (PV); Necrose (NE); Pleomorfismo celular (PI); Células claras (CC); Células rabdóides (CR); Pseudo-rosetas peri-vasculares (R); Desmoplasia estromal (DE).



4. RESULTADOS

Dos 184 casos de tumor do sistema nervoso central revisados no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, no período de 1966 a 1999, na faixa etária de 0 - 25 anos, 13 (7%) representavam tumores do plexo coróide: 5 papilomas (PP), dentre eles 1 papiloma atípico, e 8 carcinomas (CA), sendo 2 bem diferenciados (BCA) e 6 pouco diferenciados (PCA).

Dos 5 PP, 3 pacientes eram femininas e 2 masculinos, a idade variou de 1 mês a 25 anos com idade mediana de 1 ano e 6 meses. Em dois casos os tumores eram intra-ventriculares, sem outra especificação, 1 de fossa posterior / IV ventrículo, 1 em ventrículo lateral esquerdo e 1 sem informação quanto à localização. Entre os carcinomas, 6 pacientes eram femininas e 2 masculinos, a idade variou entre 5 meses e 3 anos com idade média de 11 meses. Um caso era intra-ventricular sem outra especificação, 5 de fossa posterior / IV ventrículo e em 2 não havia informações referentes à localização. Estes dados estão sumarizados na Tabela 2.

TABELA 2 - DADOS DE IDADE, SEXO E LOCALIZAÇÃO DOS TUMORES ESTUDADOS

A) PAPILOMAS DO PLEXO CORÓIDE

BIÓPSIA	IDADE	SEXO	LOCALIZAÇÃO
3907/98	1 ano	F	Ventricular
1466/94	25 anos	M	Fossa posterior
1551/93	1 mês	F	Sem informação
16312	1 ano 6 meses	M	Ventricular

B) PAPILOMA ATÍPICO DO PLEXO CORÓIDE

BIÓPSIA	IDADE	SEXO	LOCALIZAÇÃO
73848	22 anos	F	Temporal E.

C) CARCINOMAS BEM DIFERENCIADOS DO PLEXO CORÓIDE

BIÓPSIA	IDADE	SEXO	LOCALIZAÇÃO
19531/88	9 meses	F	Ventricular
6124/86	2 anos 4 meses	M	Sem informação

D) CARCINOMAS POUCO DIFERENCIADOS DO PLEXO CORÓIDE

BIÓPSIA	IDADE	SEXO	LOCALIZAÇÃO
1427/99	5 meses	F	Fossa Posterior
9283/95	5 meses	F	Fossa Posterior
13378/93	3 anos	F	Fossa Posterior
5403/93	10 meses	M	Fossa Posterior
44817/90	1 ano	F	Fossa Posterior
5298/85	2 anos	F	Sem Informação

Todos os PP apresentaram-se moderadamente celulares e exclusivamente com arranjo papilífero. As papilas eram finas ou rombas, revestidas por epitélio cúbico, cilíndrico simples ou pseudo-estratificado. Os núcleos apresentavam-se ovóides ou arredondados, com cromatina bem distribuída. Um dos 5 casos de PP mostrou pleomorfismo celular leve com núcleos levemente aumentados de volume e hipercromáticos.

Um único caso de PP apresentou heterogeneidade no padrão histológico, com áreas acinares e glandulares, um foco de microinvasão cerebral e perda focal da arquitetura papilífera (área sólida focal) no sítio de invasão, tendo sido classificado como papiloma atípico segundo os critérios histológicos de LEVY et al. (2001).

Todos os carcinomas do plexo coróide apresentaram características histológicas de malignidade, conforme definido em Material e Métodos. Invasão do tecido cerebral e necrose não foram encontradas em 4 de 8 carcinomas examinados, provavelmente por falha de amostragem. Nos 4 casos onde invasão cerebral não foi observada, não havia parênquima cerebral no material.

Neste trabalho, subdividimos os carcinomas do plexo coróide em bem e pouco diferenciados, tomando como principal critério o padrão de crescimento. Nos BCA as papilas são evidentes e nos PCA raras ou inexistentes dificultando o diagnóstico diferencial com outras entidades. Um dos casos de BCA apresentou papilas e áreas sólidas em iguais proporções, o outro caso era predominantemente papilífero.

Nos PCA, apenas um dentre 6 continha papilas, restritas a um único foco. Proliferação vascular endotelial foi encontrada em 5/6 PCA e em nenhum dos casos benignos ou carcinomas bem diferenciados. A relação entre proliferação vascular endotelial e anaplasia em astrocitomas é bem reconhecida na literatura, sendo utilizada como um dos quatro critérios para a graduação histológica dos mesmos (DAUMAS-DUPORT & SCHEITHAUER, 1988). No entanto, em tumores do plexo coróide, esta associação não foi previamente descrita. Em 4/6 casos também estava presente desmoplasia rica em células, irregular, esboçando septos curtos ou grossos. Pseudo-rosetas peri-vasculares só foram detectadas em casos de CA (2/2 BCA e 5/6 PCA) e agrupamentos focais de células rabdóides em 3/6 PCA.

As células rabdóides apresentavam nucléolo evidente, núcleo vesiculoso e citoplasma acidófilo e abundante, destituído de glóbulo hialino. O componente predominante dos PCA era constituído por células redondas ou poligonais com citoplasma escasso e mal delimitado.

Células claras foram um achado freqüente em todas as categorias tumorais, (3/5 PP, 2/2 BCA e 5/6 PCA), geralmente em áreas focais.

No plexo coróide normal dos fetos, as células claras representavam 100% das células de revestimento das papilas nos exemplos com 16 semanas gestacionais, 50% das células no período de 28 semanas e eram focais no caso com 40 semanas.

Os achados histológicos estão ilustrados nas Figuras 1 a 6 e resumidos na Tabela 3.

As mitoses, quando presentes, geralmente não ultrapassaram uma por dez campos de maior aumento; apenas um dos casos de PCA apresentou até 4 mitoses por 10 campos de maior aumento.

As áreas de necrose foram extensas (>50%) em 2/6 PCA, moderadas (20-50%) em 3/6 PCA e 1/2 BCA e pequenas (<20%) em 1/6 PCA e 1/2 BCA.

A celularidade, não incluída nesta tabela, foi intensa em todos os casos de PCA e 1 caso de BCA e moderada nos demais (5/5 PP, 1/2 BCA).

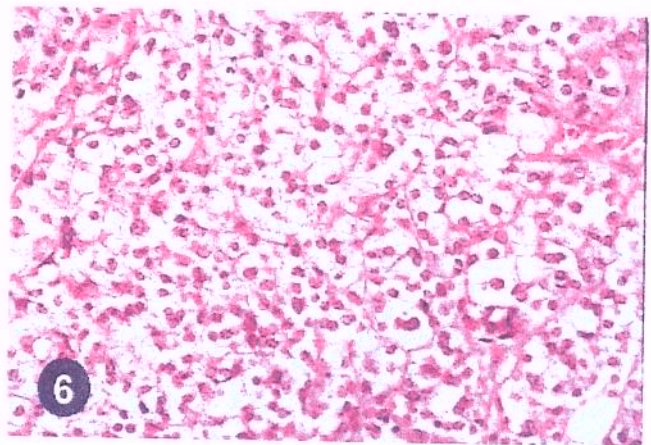
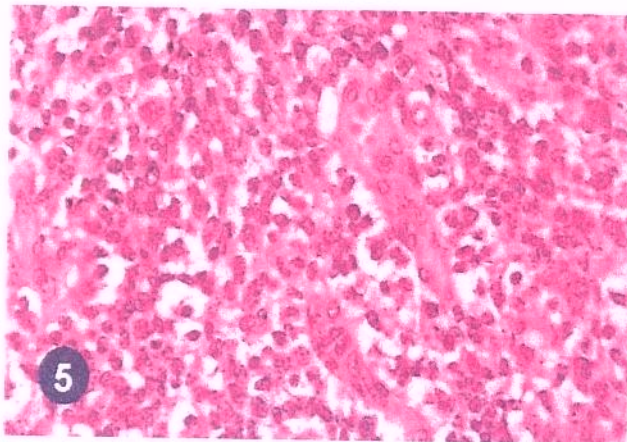
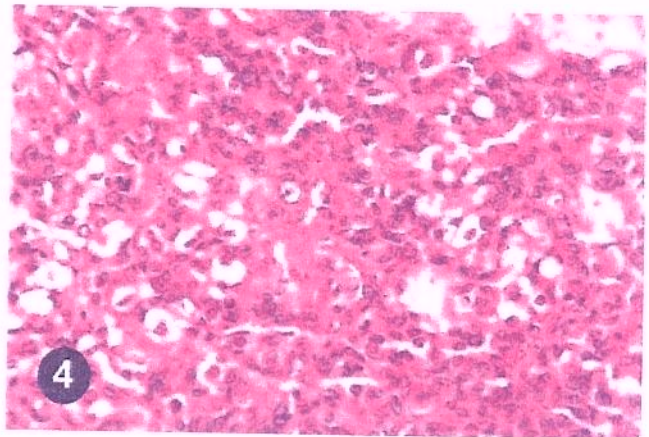
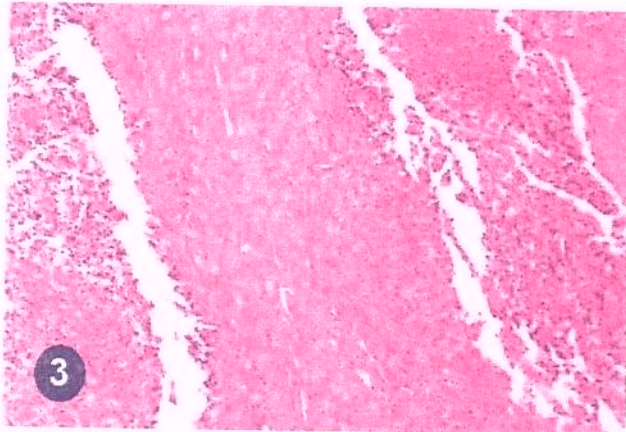
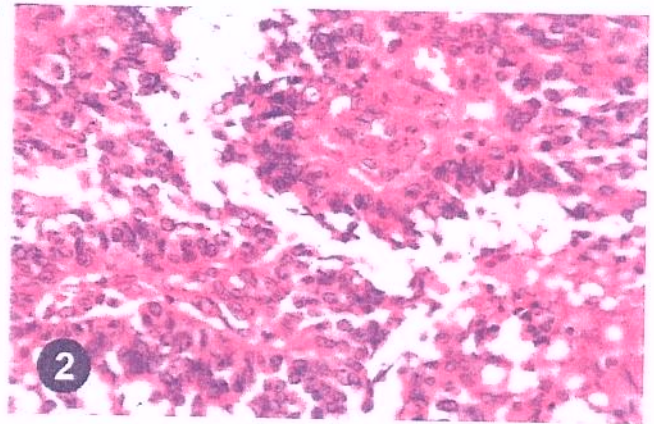
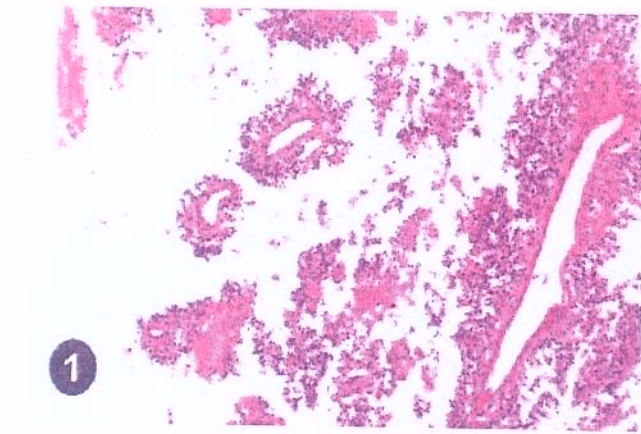
O único caso diagnosticado como papiloma atípico, marcado com *, apresentou ácinos, glândulas, área sólida focal e microinvasão cerebral.

Os achados imunoistoquímicos estão ilustrados nas Figuras 7 a 14 e resumidos na Tabela 4.

Todos (13/13) casos de tumores do plexo coróide apresentaram forte imunoreatividade para pancitoqueratina (AE1/AE3), mesmo no componente indiferenciado dos 6 PCA, sendo a reatividade focal em 3 e difusa em 3 casos. Citoqueratina de baixo peso molecular (35βH11) não foi expressa em nenhum caso de CA (8/8), mas estava presente em todos os 5 PP. Não houve expressão de citoqueratinas de alto peso molecular (34βE12) e p53 em nenhum dos casos examinados. Em 4/6 PCA, incluindo um caso destituído de células rabdóides, houve reatividade para actina muscular lisa (1A4) em 10% até 30% das células. As células 1A4 positivas estavam em distribuição peri-vascular. O anticorpo delineou com nitidez os prolongamentos celulares ancorados em paredes vasculares, e também estava presente em agrupamentos pequenos de células indiferenciadas e de padrão rabdóide, além de em esparsas células no tecido tumoral.

Os marcadores para vimentina, S100 e transtiretina foram difusa e fortemente expressos para todos os casos, exceto 1 BCA, 1 PP e 1 PCA respectivamente. GFAP só não apresentou reatividade em 1/6 PCA e 2/2 BCA. A laminina delineou com nitidez a membrana basal das papilas de todos os PCFN, BCA e 4/5 PP sendo totalmente negativa nos PCA.

Para detalhes quanto à intensidade, extensão e padrão de expressão imunoistoquímico, consultar tabelas com resultados detalhados no apêndice para cada grupo de neoplasias e para plexo coróide fetal normal.



Aspectos histológicos em carcinomas do plexo coróide.

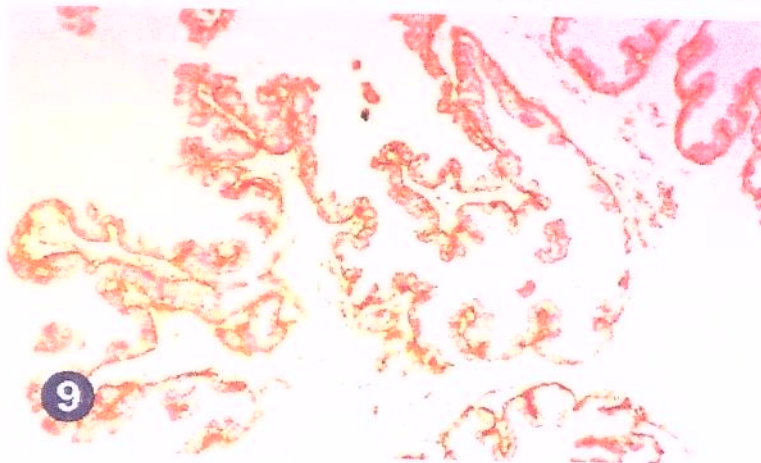
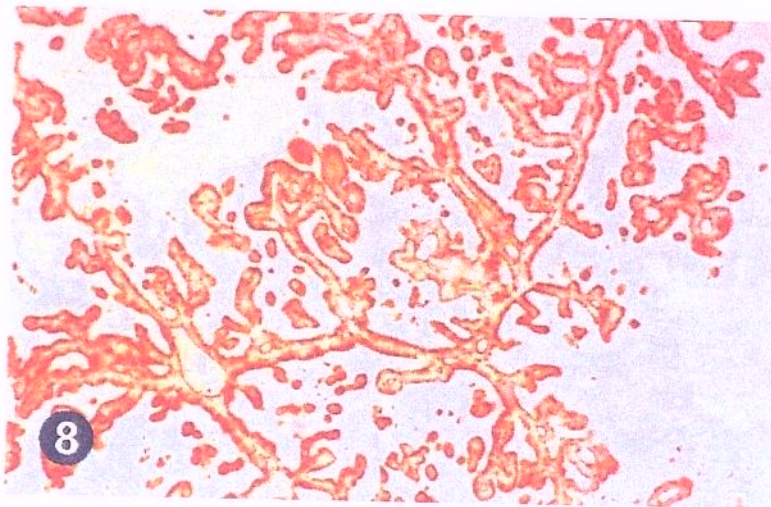
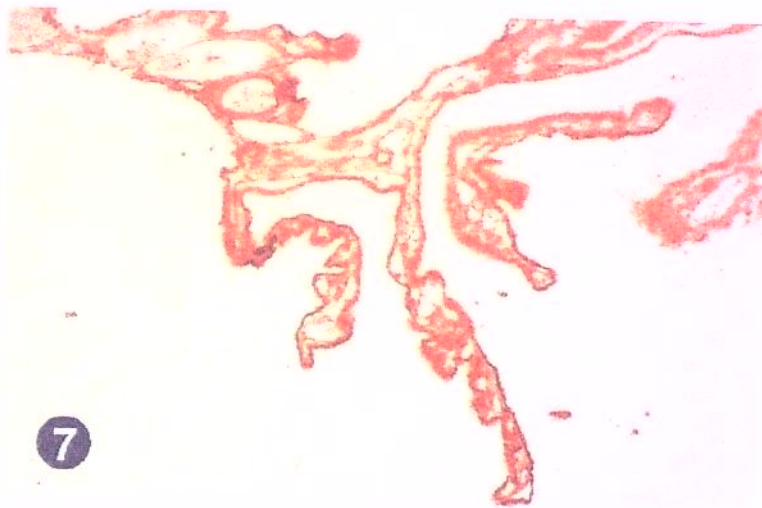
1. Pseudorosetas perivasculars. 100 x.
2. Proliferação vascular endotelial 400 x.
3. Desmoplasia. 100 x.
4. Área com células rabdóides. 400 x.
5. Alta celularidade. 400 x.
6. Área com células claras. 400 x.

TABELA 3 - ACHADOS HISTOLÓGICOS EM TUMORES DO PLEXO

CORÓIDE E NO PLEXO CORÓIDE FETAL NORMAL.

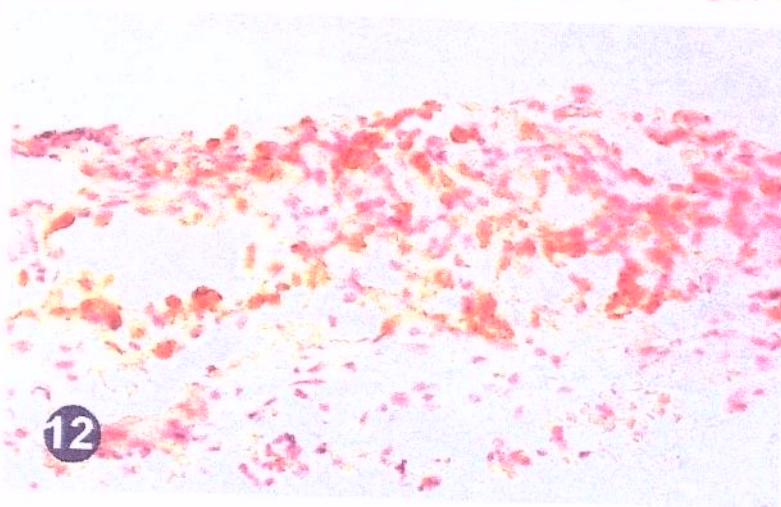
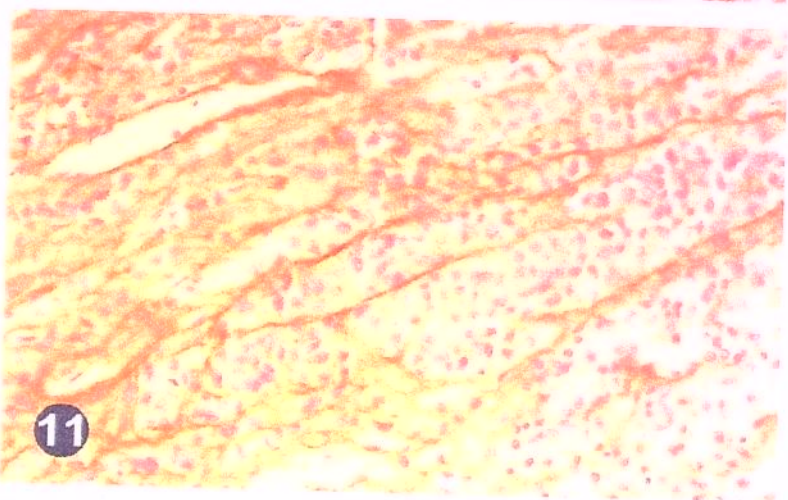
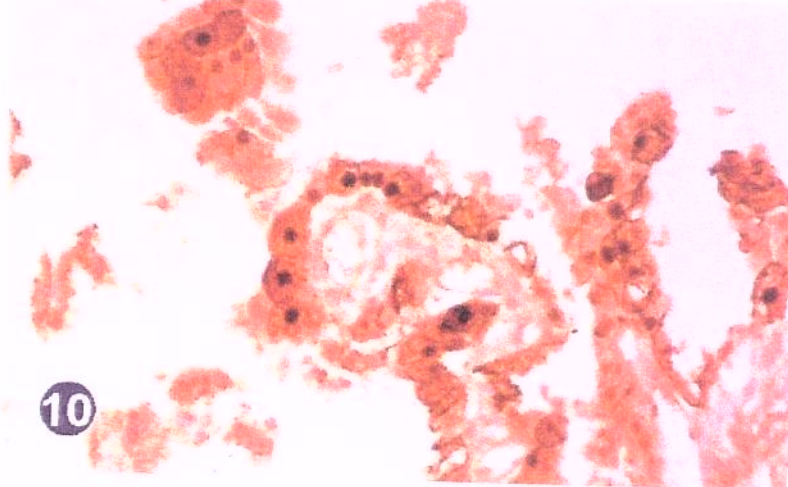
PARÂMETRO HISTOLÓGICO	PP N=5	BCA N=2	PCA N=6	PCFN N=5
Papilas	5	2	1	5
Áreas sólidas	*1	2	6	0
Ácinos	*1	0	0	0
Glândulas	*1	0	0	0
Células claras	3	2	5	5
Células rabdóides	0	0	3	0
Pseudo-rosetas	0	2	5	0
Prolif. vascular	0	0	5	0
Desmoplasia	0	0	4	0
Necrose	0	2	2	0
Pleomorfismo	1	2	6	0
Mitoses	0	2	6	0
Invasão cerebral	*1	0	4	0

Abreviações: PP= papiloma do plexo coróide; BCA= carcinoma bem diferenciado do plexo coróide; PCA= carcinoma pouco diferenciado do plexo coróide; PCFN = plexo coróide fetal normal. * Caso de papiloma atípico



Aspectos imunoistoquímicos em:

7. Plexo coróide fetal normal. GFAP. 100 x.
8. Papiloma do plexo coróide. Vimentina 100 x.
9. Idem, Laminina, 100 x.

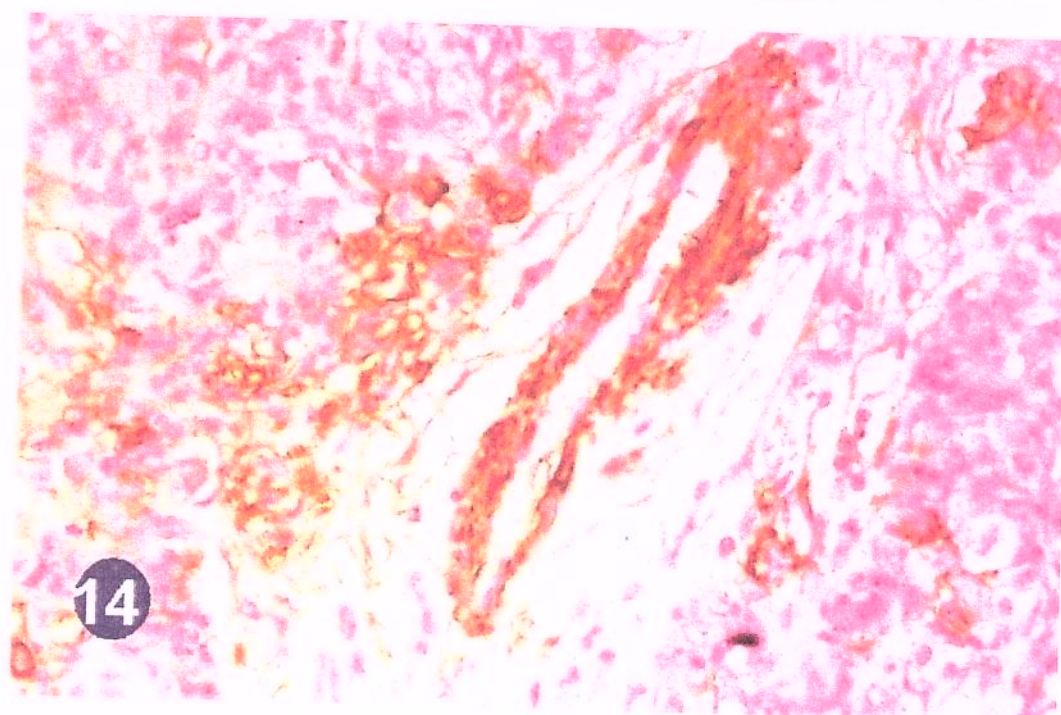
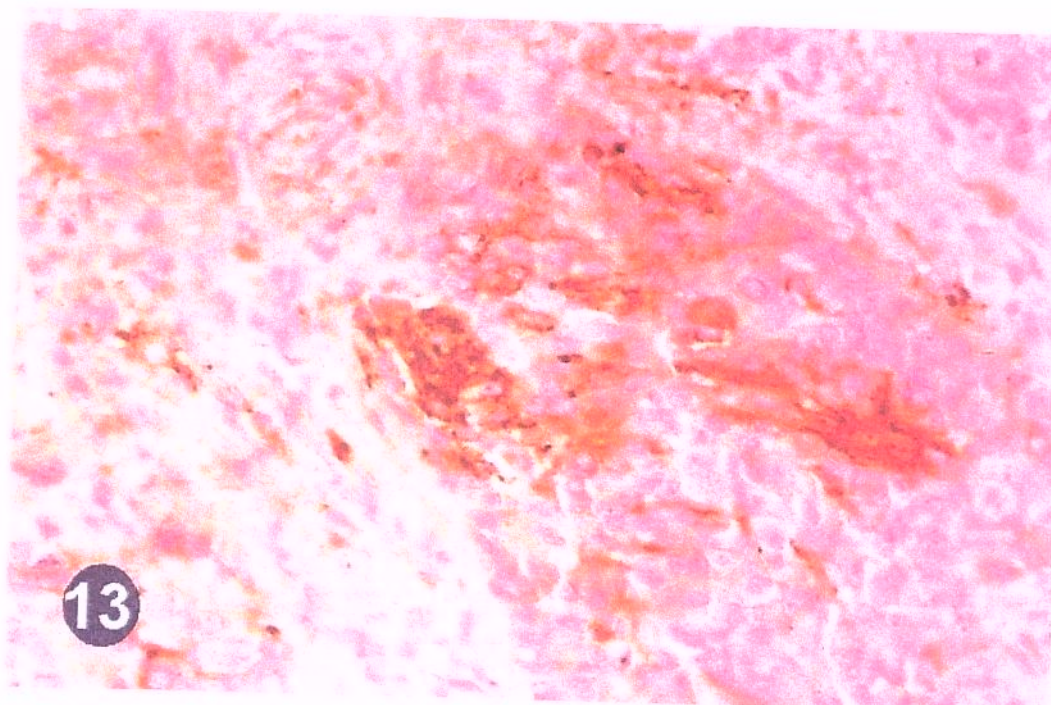


Aspectos imunoistoquímicos em:

10. Carcinoma bem diferenciado do plexo coróide. S-100. 400x.

11. Idem, Laminina, 400 x.

12. Carcinoma pouco diferenciado do plexo coróide. AE1/AE3 400x.



Aspectos imunoistoquímicos em:

13. Carcinoma pouco diferenciado do plexo coróide. Sinaptofisina, 400 x

14. Idem, 1A4, 400x.

**TABELA 4 - ACHADOS IMUNOISTOQUÍMICOS EM TUMORES DO PLEXO
CORÓIDE E PLEXO CORÓIDE FETAL NORMAL.**

Marcadores	PP	BCA	PCA	PCFN
	N=5	N=2	N=6	N=5
AE1/AE3	5	2	6	4
35βH11	5	0	0	0
34βE12	0	0	0	0
EMA	2	0	4	2
CEA	1	0	2	0
VIMENTINA	5	1	6	5
S100	4	2	6	5
NF	0	0	0	1
SNF	5	2	1	4
NSE	5	2	6	4
GFAP	5	0	5	5
TTR	5	2	5	5
DESMINA	4	0	0	3
1A4	2	0	4	2
LAMININA	4	2	0	5
p53	0	0	0	0

Abreviações: PP= papiloma do plexo coróide; BCA= carcinoma bem diferenciado do plexo coróide;
PCA= carcinoma pouco diferenciado do plexo coróide; PCFN = plexo coróide fetal normal.



5. DISCUSSÃO

Nosso trabalho consistiu inicialmente em selecionar todos os casos de tumores cerebrais infantis e de adultos jovens do Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, visto que nesta população incidem tumores raros no adulto, alguns descritos recentemente, como o ATT/RT (tumor atípico teratóide / tumor rabdóide), PXA (xantastrocitoma pleomórfico), PGNT (tumor papilífero glio-neuronal), DNT (tumor neuroepitelial disembríoplásico) e GDI (ganglioglioma desmoplásico infantil).

Durante a revisão dos casos arquivados encontramos grande dificuldade diagnóstica em tumores pouco diferenciados com componente predominante de células redondas, e localizados principalmente na fossa posterior. Os principais diagnósticos diferenciais foram ATT/RT, PNET (tumor neuroectodérmico primitivo), meduloblastoma, ependimoma anaplásico e carcinoma do plexo coróide.

Decidimos no presente trabalho centrar esforços nos tumores do plexo coróide tentando estabelecer, particularmente, as características histomorfológicas e imunoistoquímicas dos carcinomas do plexo coróide, que possam auxiliar no diagnóstico diferencial com outros tumores pouco diferenciados. Procuramos também investigar as semelhanças e diferenças entre a célula neoplásica do plexo coróide e células do plexo coróide fetal, confrontando os padrões imunoistoquímicos de ambos.

Como a incidência dos tumores do plexo coróide diminui progressivamente após a segunda década, os casos selecionados não ultrapassaram a idade de 25 anos. Nesta faixa etária, as metástases cerebrais são muito raras, por isso virtualmente não entram na lista dos diagnósticos diferenciais. No adulto, as metástases ao plexo coróide são muito mais freqüentes do que os carcinomas primários do mesmo, sendo obrigatória sua exclusão através dos marcadores apropriados (GOTTSCALK et al., 1993).

A freqüência dos tumores do plexo coróide no nosso estudo foi superior à encontrada na literatura (13/184 casos ou 7% dos tumores do SNC na faixa etária de 0 - 25 anos). A maioria dos relatos na literatura mostra incidência de 1,5 a 4% na faixa etária de 0 - 15 anos (NAKASHIMA et al., 1982; RICKERT, 2001). Houve predomínio do sexo feminino (9/13), sendo que na literatura refere-se leve predomínio do sexo masculino

(RUSSELL & RUBINSTEIN, 1989). As formas anaplásicas foram mais comuns (8 CA contra 5 PP), enquanto que o habitualmente descrito é que os papilomas representem 60 a 80% do total (PIANETTI et al., 1998). Quase metade dos casos situavam-se na fossa posterior (6/13) o que está de acordo com os achados de PIANETTI et al., (1998), que observou 39% dos casos no IV ventrículo e 9% no ângulo ponto-cerebelar.

Em 5 de 6 dos casos de PCA, observamos proliferação vascular endotelial e em 4 de 6, desmoplasia. Na literatura não encontramos referência a estes achados. É de interesse que proliferação vascular endotelial é vista com frequência em astrocitomas de alto grau, sendo inclusive um dos critérios de graduação histológica dos mesmos. É possível que a presença deste tipo de alteração nos PCA possa indicar diferenciação glial das células coróides malignas, o que é apoiado pela produção de GFAP pelas mesmas (ver abaixo).

Pseudo-rosetas peri-vasculares, por nós detectadas em 5 de 6 PCAs e 2 de 2 BCAs, também não foram relatadas anteriormente, segundo o melhor que pudemos verificar. Esta feição pode indicar diferenciação endimária das células coróides neoplásicas, uma vez que ambos tipos de célula são embriologicamente relacionadas. Deve-se porém ter em mente que o padrão pseudorosetóide pode também ser secundário à necrose isquêmica, ou seja, células distantes de vasos tendem a sofrer necrose por receber menor aporte de nutrientes. Concluimos que a alta frequência de proliferação vascular endotelial, desmoplasia e pseudo-rosetas perivasculares nos carcinomas do plexo coróide no nosso material sugere que estas feições devem fazer parte das características morfológicas desta entidade.

Um componente focal de células claras foi observado em praticamente todos os casos de tumores do plexo (3/5 PP, 2/2 BCA, 5/6 PCA). Em todos os exemplos de plexo coróide fetal este tipo celular era predominante, principalmente em idades gestacionais precoces, mostrando similaridades entre as células neoplásicas e tecido imaturo correspondente.

A presença de agrupamentos de células rabdóides em 3/6 PCA não invalida o diagnóstico de carcinoma do plexo coróide mas deve-se sempre considerar o diagnóstico diferencial com os ATT/RT, principalmente por incidirem na mesma faixa etária (maior frequência nos dois primeiros anos de vida) e porque 65% dos casos comprometem a fossa posterior (RORKE et al., 1996).

O ATT/RT foi descrito no sistema nervoso central por BIGGS et al. (1987), inicialmente designado apenas como tumor rabdóide. Posteriormente foi adicionada a denominação de tumor teratóide atípico porque a entidade possui padrão histológico polimórfico. O componente rabdóide ocorre em 100% dos casos (sendo predominante ou exclusivo em 70%). Além disso encontram-se áreas de PNET (2/3 dos casos com predomínio deste em 15 - 65%), focos epiteliais (1/4 dos casos, que podem tomar a forma de glândulas, epitélio escamoso e papilas) e áreas mesenquimatosas (1/3 dos casos).

As células rabdóides no ATT/RT são muito evidentes e geralmente apresentam estrutura globular hialina intra-citoplasmática que, à microscopia eletrônica, é composta por filamentos intermediários em feixes coesos.

O padrão histológico dos ATT/RT é distinto dos nossos casos, que são mais homogêneos e destituídos de elementos heterólogos. O componente indiferenciado dos CAs, apesar de difuso, é de aspecto epitelial, com rima citoplasmática (diferindo do equivalente nos ATT/RT, que tem padrão de PNET).

O padrão imunoistoquímico dos nossos casos também foi distinto dos descritos na literatura para ATT/RT onde só se descreve positividade para actina muscular lisa (1A4) nas células rabdóides. Nos PCA, encontramos reatividade para 1A4 não só em células rabdóides, como em células indiferenciadas e células peri-vasculares. A imunorreatividade para citoqueratinas AE1/AE3 em todos os casos de PCA, inclusive no componente indiferenciado foi fundamental para caracterizar a neoplasia como originária em plexo coróide.

Nos 4/6 de PCA que expressaram 1A4, além da reatividade para AE1/AE3, houve co-expressão de outro marcador epitelial, EMA.

A positividade para vimentina e S100 (marcadores primitivos expressos em tecidos relacionados à placa neural) em quase todos os casos de PP, CA e PCFN confirma a sua origem embriológica.

No nosso estudo não houve relação entre graus de anaplasia tumoral e reatividade para CEA, TTR e EMA, como descrito na literatura por NEWBOULD et al. (1995).

A imunorreatividade para GFAP foi forte e difusa em 5/5 PP e 5/6 PCA, o que está de acordo com a literatura. RUBINSTEIN & BRUCHER (1981) propuseram que durante o processo de transformação neoplásica, a célula epitelial do plexo coróide readquire o imunofenótipo de seu ancestral glio-ependimário, e nossos achados parecem apoiar seu ponto de vista.

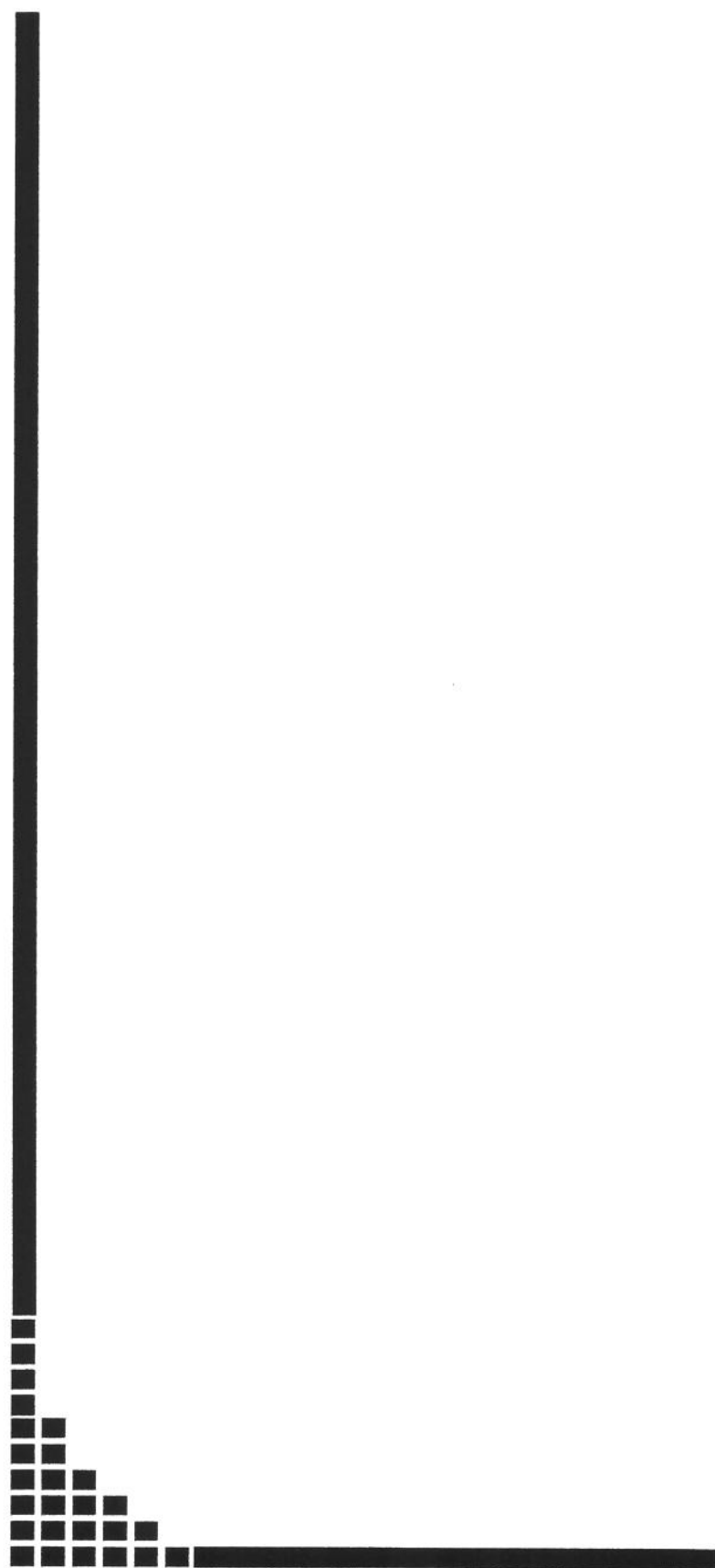
No entanto, resultados contraditórios foram obtidos referentes aos PCFN, todos os quais reagiram para GFAP. Na literatura este marcador está consistentemente ausente de plexo coróide normal de adultos e crianças. Duas explicações são plausíveis: 1) as técnicas de recuperação antigênica são mais eficientes atualmente que na década passada, quando a maioria das publicações foram feitas; ou 2) as células coróides fetais exprimem o antígeno e deixam de fazê-lo após sua completa maturação.

FURNESS et al. (1990) utilizou imunoistoquímica para laminina para demonstrar membrana basal em tumores do plexo coróide, sendo contínua e forte nos papilomas e fragmentada nos carcinomas. Em nosso trabalho, não detectamos laminina em casos de PCA. Provavelmente isto se deve à intensa indiferenciação celular dos nossos casos, aonde não havia estruturas papilares remanescentes.

A proteína supressora de tumor p53 foi negativa em todos os casos examinados sugerindo que alguma mutação deste gene não deve ser importante para a patogênese e progressão dos tumores do plexo coróide.

Resumindo, a coexpressão de vários tipos de filamentos intermediários e outras proteínas (1A4 em 66%, SNF em 16%, GFAP e TTR em 83%, VIM, S100 e NSE em 100% dos casos de PCA) pode representar reativação ou desrepressão de gens habitualmente

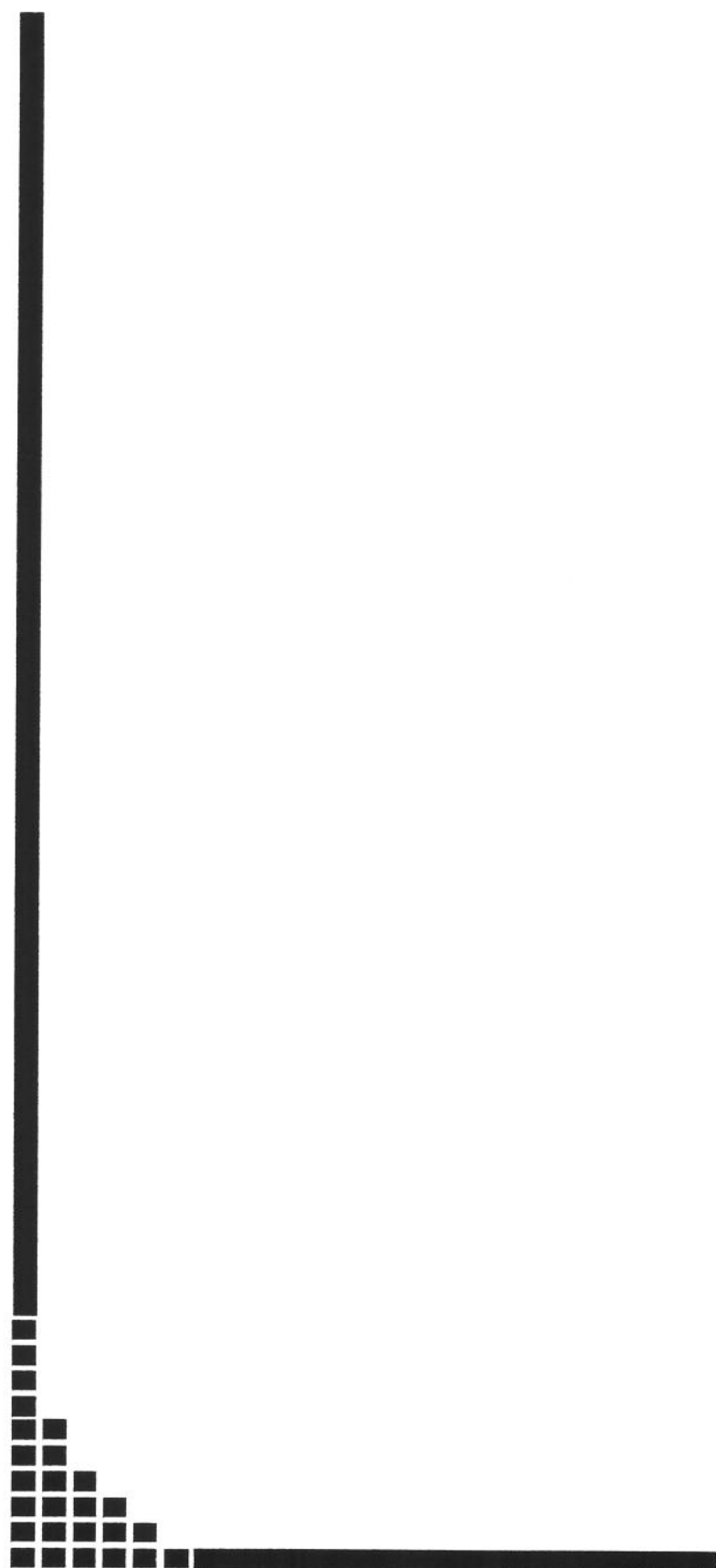
ativos só no período embrionário (repertório gênico da célula precursora, segundo RUSSELL & RUBINSTEIN, 1989). Os achados imunoistoquímicos em plexo coróide fetal confirmam esta multipotencialidade de co-expressão de marcadores pela célula imatura: VIM, TTR, S100 e GFAP em 100% dos casos; SNF, NSE e AE1/AE3 em 80%; desmina em 60%; EMA e 1A4 em 40% e NF em 20%.



6. CONCLUSÕES

Proliferação vascular endotelial, desmoplasia e pseudo-rosetas peri-vasculares só foram encontrados em casos de carcinoma do plexo coróide, sugerindo que estes três aspectos podem ser importantes para o diagnóstico de neoplasias pouco diferenciadas desta estrutura.

1. Células claras foram freqüentes tanto em papilomas quanto em carcinomas do plexo coróide, bem como no plexo coróide normal de fetos, sugerindo semelhanças entre células neoplásicas e o tecido imaturo correspondente.
2. Pseudorosetas peri-vasculares só foram vistas em carcinomas, podendo indicar diferenciação endimária nas células neoplásicas malignas.
3. Pancitoqueratinas são expressas em PP, PCA , PCFN e BCA. Citoqueratina de baixo peso molecular (35βH11) só foi expressa em PP.
4. A expressão de marcadores epiteliais (pancitoqueratinas e EMA) nos PCA, inclusive nas áreas indiferenciadas, é importante para caracterizar a origem epitelial da neoplasia.
5. Os achados imunoistoquímicos em plexo coróide fetal confirmam a multipotencialidade de expressão de marcadores pela célula imatura. O perfil de imunoreatividade dos carcinomas e papilomas do plexo coróide é semelhante ao do plexo coróide fetal normal, sugerindo que, durante o processo de transformação neoplásica, as células recapitulam o padrão primitivo.
6. Laminina não foi detectada nos casos de carcinomas pouco diferenciados, mas foi útil para delinear a membrana basal dos PP, BCA e PCFN.
7. Mutações do gene p53 parecem não ser importantes para a patogênese e progressão dos tumores do plexo coróide.



7. SUMMARY

Background: Choroid plexus tumors (CPT) are rare. Literature shows great variation in immunohistochemical reactivity of several markers. Results are controversial even regarding the immunohistochemical profile of normal choroid plexus.

Objectives: To study the immunohistochemical pattern of CPT, in order to obtain helpful data for differential diagnosis of anaplastic tumors. To compare the findings with the immunoprofile of normal fetal choroid plexus (NFCP) to evaluate whether during neoplastic transformation the cells regain fetal features.

Material & Methods: 13 CPT were diagnosed in our service between 1966 and 1999 in patients up to 25 years old: 5 papillomas (PP), 2 well differentiated carcinomas (WCA), 6 poorly differentiated carcinomas (PCA) and 5 NFCP were submitted to immunohistochemical study on paraffin sections using a panel including epithelial, neuronal and stromal markers.

Results/Conclusions: Pancytokeratin AE1/AE3 was strongly positive in all 13 cases, even in the undifferentiated component of PCA, where reactivity was focal in 3 and diffuse in 3 cases. In contrast with the literature, low molecular weight cytokeratin (35 β H11) was not expressed in any of the 8 cases of carcinoma, but was present in all 5 PP. In 4/6 PCA there was reactivity for smooth muscle actin (1A4) in 10 to 30% of the cells. This was true also for one case lacking rhabdoid cells. In contrast with the literature laminin was not a helpful tool in the diagnosis of PCA, as it was undetectable in all 6 cases. All 5 NFCP expressed GFAP, in contrast with previous reports. Lack of expression of 35 β H11 among NFCP (0/5 cases) was similar to what was observed in carcinomas, and differed from expression in all of PP. This may indicate that upon malignant transformation neoplastic cells regain some immunohistochemical features of fetal cells.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, S.; BAYER, T.A.; KRAUS, J.A.; et al. - Transthyretin expression in medulloblastomas and medulloblastoma cell lines. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, **21**:399-409, 1995.
- ANG, L.C.; TAYLOR, A.R.; BERGIN, D.; et al. - An immunohistochemical study of papillary tumors in the central nervous system. **Cancer**, **65**(12):2712-2719, 1990.
- ANGUILAR, D.; MARTÍN, J.M.; ANEIROS, J.; et al. - The fine structure of choroid plexus carcinoma. **Histopathology**, **7**:939-946, 1983.
- BERGSAGEL, D.J.; FINEGOLD, M.J.; BUTEL, J.S.; et al. - DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. **N. Engl. J. Med.**, **326**:988-993, 1992.
- BIGGS, P.J.; GAREN, P.D.; POWERS, J.M.; et al. - Malignant rhabdoid tumor of the central nervous system. **Hum. Pathol.**, **18**:332-337, 1987.
- BURGER, P.C. - ATT of the CNS: A highly malignant tumor of infancy and childhood frequently mistaken for medulloblastoma. **Am. J. Surg. Pathol.**, **22**:1083-1092, 1998.
- CATALA, M. - Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebrospinal fluid in man and other species. Part I: The ventricular system, meninges and choroid plexuses. **Arch. Anat. Cytol. Pathol.**, **46**:153-69, 1998.
- CHOW, E.; JENKINS, J.J.; BURGER, P.C.; et al. - Malignant evolution of choroid plexus papilloma. **Pediatr. Neurosurg.**, **31**:127-130, 1999.
- CRUZ-SANCHEZ, F.F.; ROSSI, M.L.; HUGHES, J.T.; et al. - Choroid plexus papillomas: an immunohistological study of 16 cases. **Histopathology**, **15**:61-69, 1989.
- DAUMAS-DUPORT, C.; SCHEITHAUER, B.; O'FALLON, J.; et al. - Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. **Cancer**, **62**:2152-2165, 1988.

- DOGLIONI, C.; DELL'ORTO, P.; COGGI, G.; et al. - Choroid plexus tumors. An immunocytochemical study with particular reference to the coexpression of intermediate filament proteins. **Am. J. Pathol.**, **127**:519-529, 1987.
- FELIX, C.A.; SLAVC, I.; DUNN, M.; et al. - p53 gene mutations in pediatric brain tumors. **Med. Pediatr. Oncol.**, **25**:431-436, 1995.
- FELIX, I.; PHUDHICHAREONRAT, S.; HALLIDAY, W.C.; et al. - Choroid plexus tumors in children: Immunohistochemical and scanning-electron- microscopic features. **Pediat. Neurosci.**, **13**:263-269, 1987.
- FIELDS, W.S. - Symposium: Brain tumours. Morphological aspect and classification. **Brain Pathol.**, **3**:251-297, 1993.
- FINK, K.L.; RUSHING, E.J.; SCHOLD, S.C. JR.; et al. - Infrequency of p53 gene mutations in ependymomas. **J. Neurooncol.**, **27**:111-115, 1996.
- FURNESS, P.N.; LOWE, J.; TARRANT, G.S.. - Subepithelial basement membrane deposition and intermediate filaments coexpression in choroid plexus neoplasms and ependymomas. **Histopathology**, **16**:251-255, 1990.
- GABRION, J.; PERALDI, S.; FAIVRE-BAUMAN, A.; et al. - Characterization of ependymal cells in hypothalamic and choroidal primary cultures. **Neuroscience**, **24**:993-1007, 1988.
- GOTTSCHALK, J.; JAUTZKE, G.; PAULUS, W.; et al. - The use of immunomorphology to differentiate choroid plexus tumors from metastatic carcinomas. **Cancer**, **72**:1343-1349, 1993.
- GYURE, K.A.; MORRISON, A.L. - Cytokeratin 7 and 20 expression in choroid plexus tumors: utility in differentiating these neoplasms from metastatic carcinomas. **Mod. Pathol.**, **13**:638-643, 2000.

- HERBERT, J.; CAVALLARO, T.; DWORK, A.J. - A marker for primary choroid plexus neoplasms. **Am. J. Pathol.**, **136**:1317-1325, 1990.
- KASPER, M.; GOERTCHEN, R.; STOSIEK, P.; et al. - Coexistence of cytokeratin, vimentin and neurofilament protein in human choroid plexus. An immunohistochemical study of intermediate filaments in neuroepithelial tissues. **Virchows Arch. A.**, **410**:173-177, 1986.
- KASPER, M.; KARSTEN, U. - Focal ependymal differentiation in the choroid plexus of human newborn brain confirmed by immunohistochemistry with monoclonal antibodies. **Acta Neuropathol.**, **73**:409-410, 1987.
- KLEIHUES, P.; BURGER, P.C.; SCHEITHAUER, B.C. - **Histological Typing of Tumours of Central Nervous System**. Berlin, Springer, 1993. 112p.
- KLEIHUES, P.; BURGER, P.C.; SCHEITHAUER, B.C. - The WHO Classification of Brain Tumours. **Brain Pathol.**, **3**:255-268, 1993.
- KOUNO, M.; KUMANISHI, T.; WASHIYAMA, K.; et al. n An immunohistochemical study of cytokeratin and glial fibrillary acidic protein in choroid plexus papilloma. **Acta Neuropathol.**, **75**:317-320, 1988.
- LEVY, M.L.; GOLDFARB, A.; HYDER, D.J. et al. - Choroid plexus tumors in children: significance of stromal invasion. **Neurosurgery**, **48**:303-309, 2001.
- LOPES, M.B.; ROSEMBERG, S.; DE ALMEIDA, P.C.; et al.. - Glial fibrillary acidic protein and cytokeratin in choroid plexus tumors. An immunohistochemical study. **Pathol. Res. Pract.**, **185**:339-341, 1989.
- MANNOJI, H.; BECKER, L.E. - Ependymal and choroid plexus tumors. Cytokeratin and GFAP expression. **Cancer**, **61**:1377-1385, 1988.
- MATSON, E. & CROFTON, J. - Papilloma of choroid plexus in childhood. **Neurosurgery**, **17**:1002-1027, 1960.

- MATSUSHIMA, T. - Choroid plexus papillomas and human choroid plexus. A light and electron microscopic study. **J. Neurosurg.**, **59**:1054-1062, 1983.
- MCCOMB, R.D.; BURGER, P.C. - Choroid plexus carcinoma. Report of a case with immunohistochemical and ultrastructural observations. **Cancer**, **51**:470-475, 1983.
- MIETTINEN, M.; CLARK, R.; VIRTANEN, I. - Intermediate filament proteins in choroid plexus and ependyma and their tumors. **Am. J. Pathol.**, **123**:231-240, 1986.
- MUTHUPHEI, M.N. - Divergent differentiation in choroid plexus papilloma. An immunohistochemical study of five cases. **Cent. Afr. J. Med.**, **41**:103-104, 1995.
- NAKASHIMA, N.; GOTO, K.; TAKEUCHI, J. - Papillary carcinoma of choroid plexus. Light and electron microscopic study. **Virchows Arch. (Pathol. Anat)**, **395**:303-318, 1982.
- NEWBOULD, M.J.; KELSEY, A.M.; ARANGO, J.C.; et al. - The choroid plexus carcinomas of childhood: histopathology, immunocytochemistry and clinicopathological correlations. **Histopathology**, **26**:137-143, 1995.
- OKA, H.; SCHEITHAUER, B.W. - Clinicopathological characteristics of atypical teratoid/rhabdoid tumor. **Neurol. Med. Chir.**, **39**:510-518, 1999.
- PACKER, R.J.; PERILONGO, G.; JOHNSON, D.; et al. - Choroid plexus carcinoma of childhood. **Cancer**, **69**:580-585, 1992.
- PENCALET, P.; SAINTE-ROSE, C.; LELLOUCH-TUBIANA, A., et al. - Papillomas and carcinomas of the choroid plexus in children. **J. Neurosurg.**, **88**:521-528, 1998.
- PIANETTI, G.; FONSECA, L.F. - Tumores do plexo coróideo. **Arq. Neuropsiquiatr.**, **56**:223-231, 1998.
- RADOTRA, B.D.; JOSHI, K.; KAK, V.K.; et al. - Choroid plexus tumours – an immunohistochemical analysis with review of literature. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, **37**:9-19, 1994.

- RAIMONDI, A.J.; GUTIERREZ, F.A. - Diagnosis and surgical treatment of choroid plexus papillomas. **Childs Brain**, 1:81-115, 1975.
- RICKERT, C.H.; PAULUS, W. - Tumours of the choroid plexus. **Microsc. Res. Tech.**, 52:104-111, 2001.
- ROBINOW, M. - Aicardi syndrome, papilloma of choroid plexus, cleft lip and cleft of the posterior palate. **J. Pediat.**, 104:404-405, 1984.
- RORKE, L.B.; PACKER, R.J.; BIEGEL, J.A. - Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood. **J. Neurooncol.**, 24:21-28, 1995.
- RORKE, L.B.; PACKER, R.J.; BIEGEL, J.A. - Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: definition of an entity. **J. Neurosurg.**, 85:56-65, 1996.
- RUBINSTEIN, L.J.; BRUCHER, J.M. - Focal ependymal differentiation in choroid plexus papillomas. An immunoperoxidase study. **Acta Neuropathol.**, 53:29-33, 1981.
- RUBINSTEIN, L.J. - **Tumors of the central nervous system**. Armed Forces Institute of Pathology. Washington-DC, 1972. p.257-262.
- RUSSELL, D.S.; RUBINSTEIN, L.J. - **Pathology of tumours of the nervous System**. 5th ed. London, Arnold, 1989. p.394-404.
- SARNAT, H.B. - Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunocytochemical markers. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 51:58-75, 1992.
- SREENAN, J.J.; PRAYSON, R.A. - Gliosarcoma. A study of 13 tumors, including p53 and CD34 immunohistochemistry. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, 121:129-133, 1997.
- STAUDT, J.; STUBER, P. - Morphological studies of the matrix in human hypothalamus. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch.**, 91:773-786, 1977.

- TARATUTO, A.L.; MOLINA, H.; MONGES, J. - Choroid plexus tumors in infancy and childhood. Focal ependymal differentiation. An immunoperoxidase study. **Acta Neuropathol.**, **59**:304-308, 1983.
- VAJTAI, I.; VARGA, Z. - Teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system (in Hungarian). **Orv. Hetil.**, **139**:29-34, 1998.
- VARGA, Z.; VAJTAI, I. - Prognostic markers in the histopathological diagnosis of tumors of the choroid plexus (in Hungarian). **Orv. Hetil.**, **139**:761-765, 1998.
- ZULCH K. J. - **Brain Tumors. Their Biology and Pathology.** New York, Springer-Verlang, 1996. p. 257-267.



9. APÊNDICE

PLEXO CORÓIDE NORMAL DE FETOS

	VIM	S100	GFAP	TTR	AE1/ AE3	34βE 12	35βE 11	EMA	CEA	NF	SNF	NSE	DES	1A4	LAM	p53
10719- 40sem	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P	I E P
	c	c	c	c	-	-	-	-	-	-	-	c	c	c	m	-
0		n			X X	X X	X X	X X	X X	X X	X X				X X	X X
1																
2	X X		X										X			
3		X		X								X	X	X		
4		X	X	X								X				
11042- 28sem																
	c	c	c	c	a	-	m	-	-	c	c	c	a	c	m	-
0					X	X X	X X	X X	X X					X X	X X	X X
1																
2	X		X				X			X	X		X	X	X	
3	X	X		X	X		X	X				X	X			
4	X	X	X	X						X	X	X				
11109- 16sem																
	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	a	a	a	-	m	-
0		n				X X	X X	X X	X X	X X				X X	X X	X X
1																
2			X X		X X						X		X		X	
3	X	X		X												
4	X	X		X												

PLEXO CORÓIDE NORMAL DE FETOS

	VIM	S100	GFAP	TTR	AE1/ AE3	34βE 12	35βE 11	EMA	CEA	NF	SNF	NSE	DES	1A4	LAM	p53
11183- 28sem	I E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I
		c	c	c	a	-	-	-	-	-	-	a	c	-	-	m
0						X X	X X	X X	X X	X X	X X			X X		X X
1					X										X	
2																
3	X	X	X	X								X	X			
4	X	X	X	X								X	X		X	
11304- 16sem	I E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	-	I E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I	E P I
		a	a	c	a	X X	-	-	a	-	-	a	-	-	-	m
0							X X	X X		X X	X X		X X	X X		X X
1															X	
2			X		X				X			X X				
3	X	X		X												
4	X	X	X	X	X										X	

PAPILOMAS

[illegible]

PAPILOMA ATÍPICO

	VIM	S100	GFAP	TTR	AE1/ AE3	34βE 12	35βE 11	EMA	CEA	NF	SNF	NSE	DES	1A4	LAM	p53
	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I
		c		c		c		-		-		c		-		m
		n														
73848	0					X	X	X	X	X	X	X	X			X
	1			X										X		
	2	X		X										X		
	3	X	X	X	X		X				X	X		X		
	4	X		X	X		X					X			X	

Nota: Caso 73848:

S100 - negativo nas áreas sólidas, glandulares e mucosas

TTR - positivo nas áreas glandulares e papilíferas e negativo na área sólida

CEA - foi positivo focalmente em área sólida, menos de 10% das células, por isso não foi considerado positivo.

NSE e SNF - positivo em todas as áreas.

1A4 - positivo nas áreas papilíferas.

CARCINOMA BEM DIFERENCIADO DO PLEXO CORÓIDE

	VIM	S100	GFAP	TTR	AE1/ AE3	34βE 12	35βE 11	EMA	CEA	NF	SNF	NSE	DES	1A4	LAM	p53
	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I
19531/88																
c /m/ n/ a	-	c	-	c	c	-	-	-	-	-	c	c	-	-	m	-
0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1		X	X								X					
2												X			X	
3				X	X						X	X				
4				X												
6124/86	c	c	-	c	c	-	-	-	-	-	c	c	-	-	m	-
0			X	X		X	X	X	X	X			X	X	X	X
1											X	X			X	
2	X										X	X			X	
3	X	X		X	X											
4		X		X												

CARCINOMA POUCO DIFERENCIADO DO PLEXO CORÓIDE

	VIM	S100	GFAP	TTR	AE1/ AE3	34βE 12	35βE 11	EMA	CEA	NF	SNF	NSE	DES	1A4	LAM	p53
1427/99	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I
		C		C		C		C		-		-		C		-
	0								X	X			X		X	X
	1			X												
	2				X							X		X		
9283/95	3	X			X			X								
	4	X	X													
		C		C		C		C		-		-		C		-
	0								X	X			X		X	X
5403/93	1											X				
	2			X												
	3	X	X	X				X						X		
	4	X														
		I	E	P	I	E	P	I	E	P	I	E	P	I	E	P
5403/93		C		C		C		C		-		-		C		-
	0								X	X			X		X	X
	1															
	2				X			X				X				
	3	X	X	X	X									X		
	4															

	VIM	S100	GFAP	TTR	AE1/ AE3	34βE 12	35βE 11	EMA	CEA	NF	SNF	NSE	DES	1A4	LAM	P53
44817																
c/n / m/ a		c	c	c	c		-	c		-		c	-	c	-	-
0						X	X		X	X	X		X		X	X
1			X	X				X						X		
2																
3	X	X	X	X	X							X		X		
4		X														
13378/93																
c/ m/ n/ a		c	c	c	c	-	-	-	c	-	-	c	-	-	-	-
0						X	X	X		X	X		X	X	X	X
1	X	X	X		X				X							
2				X								X				
3	X	X							X			X				
4				X												
		c	c	c	c	-	-	-	c	c	c	c	-	-	-	-
5298/85						X	X	X		X			X	X	X	X
0						X	X	X		X			X	X	X	X
1			X	X							X					
2									X		X	X				
3	X	X	X	X	X				X							
4	X	X	X													