

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA POR
IMUNO-HISTOQUÍMICA DE GENES RELACIONADOS A
ALTERAÇÕES NO CROMOSSOMO 9p EM LINFOMA DE
GRANDES CÉLULAS B PRIMÁRIO DO MEDIASTINO E
SUA RELAÇÃO COM MARCADORES DE
PROLIFERAÇÃO E CICLO CELULAR**

CARLOS AUGUSTO MOREIRA SILVA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Oncologia**

Orientador: Dr. José Vassallo

**São Paulo
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Carlos Augusto Moreira

Caracterização da expressão proteica por imuno-histoquímica de genes relacionados no cromossomo 9P em linfoma de grandes células b primário do mediastino e sua relação com marcadores de proliferação e ciclo celular /

Carlos Augusto Moreira Silva – São Paulo, 2015.

89p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia

Orientador: José Vassallo

Descritores: 1. LINFOMA. 2. MEDIASTINO. 3. CROMOSSOMOS HUMANOS PAR 9. 4. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 5. SOBREVIDA. 6. PROGNÓSTICO. 7. PROLIFERACAO CELULAR. 8. CICLO CELULAR.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Vassallo pela confiança, incentivo e orientação desta tese. Agradeço eternamente por me proporcionar o ensino da Hematopatologia durante todos estes anos de convivência. Muito obrigado mestre.

Ao Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima e a Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini pelas importantes sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Isabela Werneck da Cunha pela disponibilidade nas análises do FISH.

Ao Dr. Antônio Hugo José Froes Marques Campos pelo importante auxílio com as análises estatísticas.

Ao sempre prestativo José Ivanildo Neves pela execução técnica do FISH e algumas reações imuno-histoquímicas.

A Marina França Resende e Suely Nonogaki pela disponibilidade e agilidade na execução das reações imuno-histoquímicas.

Aos técnicos (Severino e Carlos) e secretária Liliane que integram a equipe de patologia investigativa do AC Camargo Cancer Center.

A todos os funcionários dos setores de arquivos de blocos e lâminas dos departamentos de Anatomia Patológica dos hospitais que forneceram casos ao estudo.

A todos os funcionários dos serviços de arquivos médicos dos hospitais que forneceram casos ao estudo.

A Dra. Adriana Helena Moreira pela disponibilidade no fornecimento de dados clínicos coletados de muitos casos utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Roberto Pinto Paes (Departamento de Anatomia Patológica do Hospital da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo) pelo apoio e disponibilidade.

A bibliotecária Suely Francisco (Biblioteca do .A.C. Camargo Cancer Center) pelo auxílio na confecção do manuscrito e a Sra. Maria Aparecida pelo auxílio na revisão gramatical.

A todos os funcionários da pós-graduação, sobretudo a Ana Kuninari, Luciana Pitombeira e Vanuza Barros, pela cordialidade e auxílio.

A todos os funcionários e mestres do departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo ensino da Anatomia Patológica e apoio intermitente na minha vida profissional.

Aos inesquecíveis amigos Dr. Manoel Soares e Dra. Gilberta Bensabath (Instituto Evandro Chagas – Belém – Pará), pelo paternalismo acadêmico e apoio na minha formação médica.

A minha eterna esposa Sabrina pelo companheirismo, paciência, apoio e incentivo durante estes 4 anos de trabalho.

Aos meus pais Ana Lúcia e Augusto Cézar por terem me proporcionado o maior e melhor presente que poderiam me ofertar, a minha educação.

Enfim a todos que contribuíram para tornar este sonho possível, o meu muito obrigado.

RESUMO

Silva CAM. **Caracterização da expressão proteica por imuno-histoquímica de genes relacionados a alterações no cromossomo 9p em linfoma de grandes células B primário do mediastino e sua relação com marcadores de proliferação e ciclo celular.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O linfoma de grandes células B primário mediastinal tímico (LBPM) possui alterações genéticas particulares, dentre as quais, amplificação da região cromossômica 9p. Recentes estudos correlacionam à patogênese do LBPM alguns genes (JMJD2c, SOCS1, STAT6, JAK2 e PDL1) associados direta ou indiretamente a esta região cromossômica. Estes são responsáveis por ativarem ou bloquearem diversas vias de sinalização que promovem aumento da atividade proliferativa celular e/ou escape a mecanismos imunes de defesa do hospedeiro, originando fenômenos oncogênicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão proteica por imuno-histoquímica de genes relacionados a alterações cromossômica no 9p e correlacioná-las à expressão de marcadores relacionados à proliferação e ciclo celular, bem como a parâmetros clínicos e evolutivos. Para tanto, avaliamos 63 pacientes procedentes de 5 instituições do Estado de São Paulo diagnosticados no período de 1975 a 2011. Expressão de JAK2 ($p=0,0009$), PDL1 ($p=0,0007$) e p16 ($p=0,0058$) bem como estágio clínico agrupado ($p=0,0015$) e IPI ($p<0,0001$), foram fatores prognósticos relacionados a melhor sobrevida global. Concluímos que a utilização destes parâmetros poderão estratificar grupos prognósticos e terapêuticos em LBPM e que o p16 é um biomarcador robusto em LBPM. Destacamos também o papel da imuno-histoquímica como ferramenta auxiliar acessível para detecção da expressão de JAK2 e PDL1, selecionando pacientes que poderão eventualmente ser beneficiados com terapias alvos / imunoterapia.

SUMMARY

Silva CAM. [**Characterization of protein expression by immunohistochemistry of genes related to changes in chromosome 9p in primary mediastinal large B-cell lymphoma and its relationship with proliferation markers and cell cycle**]. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Thymic primary mediastinal large B-cell lymphoma (LBPM) has particular genetic changes, among which, amplification of chromosome 9p region. Recent studies correlate some genes (JMJD2c, SOCS1, STAT6, JAK2 and PDL1) directly or indirectly related to this chromosome region to the pathogenesis of LBPM. These are responsible for activating or blocking several signaling pathways that result in increased cell proliferative activity and / or escape the immune defense mechanisms of the host, leading to oncogenic phenomena. The objective of this study was to evaluate the protein expression by immunohistochemistry of genes related to chromosomal alterations in 9p and correlates them the expression of markers related to proliferation and cell cycle as well as clinical and outcome parameters. Therefore, we evaluated 63 patients coming from 5 institutions of the State of São Paulo diagnosed from 1975 to 2011. Expression JAK2 ($p = 0.0009$), PDL1 ($p = 0.0007$) and p16 ($p = 0.0058$) grouped clinical stage ($p = 0.0015$) and IPI ($p < 0.0001$) were prognostic factors related to better overall survival. We conclude that the use of these parameters can stratify prognostic and therapeutic groups in LBPM and that p16 is robust biomarker in LBPM. We also highlight the role of immunohistochemistry as a useful auxiliary tool for the detection of JAK2 and PDL1 expression by selecting patients who may eventually benefit from targeted / immunotherapy therapies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	As duas principais vias de sinalização (JAK-STAT e NFK-B) alteradas no LBPM.....	8
Figura 2	Aspectos clínicos, epidemiológicos, histológicos e IHQ dos diagnósticos diferenciais de.....	17
Figura 3	Via JAK-nuclear.....	21
Figura 4	Impacto das alterações genéticas ao microambiente tumoral.....	22
Figura 5	Participação da via JAK-STAT na promoção da passagem da fase G1 para fase S no ciclo celular.....	24
Figura 6	Interação das proteínas relacionadas ao ciclo e proliferação.....	24
Figura 7	Algoritmo do estudo.....	26
Figura 8	Distribuição por gênero e procedência dos 63 casos.....	38
Figura 9	Aspecto histológico predominante com células grandes.....	44
Figura 10	Achados histológicos incomuns.....	44
Figura 11	Exemplos dos achados IHQ para os marcadores relacionados a patogênese do LBPM.....	46
Figura 12	Exemplos das reações IHQ relacionadas ao ciclo celular.....	47
Figura 13	Sobrevida global relacionada ao estágio clínico agrupado.....	52

Figura 14	Sobrevida global relacionada ao sítio da lesão.....	53
Figura 15	Sobrevida global relacionada ao IPI agrupado.....	53
Figura 16	Sobrevida global relacionada ao IPI isolado.....	54
Figura 17	Sobrevida global relacionada à raça.....	54
Figura 18	Sobrevida global relacionada ao resultado do p16.....	55
Figura 19	Sobrevida global relacionada ao resultado do JAK2.....	55
Figura 20	Sobrevida global relacionada ao resultado do PDL1.....	56
Figura 21	Sobrevida global relacionada a presença ou ausência dos fatores..	56
Figura 22	Sobrevida global relacionada ao tipo de QT utilizada.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos e epidemiológicos.....	39
Tabela 2	Resposta ao tratamento por tipo de QT empregada.....	43
Tabela 3	Resultado dos marcadores IHQ relacionados a patogênese.....	45
Tabela 4	Resultado dos marcadores IHQ relacionados ao ciclo celular.....	47
Tabela 5	Dados relativos a avaliação do Ki-67.....	48
Tabela 6	Resultados do FISH (9p).....	49
Tabela 7	Características clínicas, evolutivas e resultado do p16.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação dos genes alterados envolvidos na patogênese.....	9
Quadro 2	Índice de Prognóstico Internacional (IPI) e variantes.....	12
Quadro 3	Especificações técnicas dos marcadores IHQ relacionados ao ciclo e proliferação celular.....	32
Quadro 4	Especificações técnicas dos marcadores IHQ relacionados a patogênese.....	32
Quadro 5	Método semi-quantitativo empregado para avaliação da positividade das reações IHQ.....	33
Quadro 6	Dados de tratamento e evolução clínica.....	41
Quadro 7	Correlação dos parâmetros clínicos com IHQ e FISH 9p.....	58
Quadro 8	Correlação dos marcadores IHQ entre si e com o FISH9p.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Do inglês, <i>Protein kinase B (PKB)</i>
BCL2	Do inglês, <i>B-cell CLL/lymphoma 2 protein</i>
BCL6	Do inglês, <i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
CD	Do inglês, <i>Cluster of differentiation</i>
CG	Centro germinativo
CHOP	Do inglês, <i>Cyclophosphamide-hydroxydaunomycin- (Oncovin) Vincristine-prednisone</i>
DA-EPOCH-R	Do inglês, <i>Dose adjusted etoposide, prednisone, (Oncovin) vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin - Rituximab</i>
LDH	Lactato Desidrogenase Sérica
FOXP1	Do inglês, <i>Forkhead box P1</i>
FISH	Do inglês, <i>fluorescent in situ hybridization</i>
GCET1	Do inglês, <i>Germinal Center B-cell Expressed Transcript 1</i>
ACCCC	AC Camargo Cancer Center
HCB	Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HSCSP	Hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
IHQ	Imuno-histoquímica (os)
IPI	Índice de prognóstico internacional
IRF4	Do inglês, <i>Interferon regulatory factor 4</i>
JAK2	Do inglês, <i>Janus Kinase 2 gene</i>
JMJD2c	Do inglês, <i>Jumonji domain 2c / Lysine-specific demethylase 4C</i>
LA	Linfócito ativado
LBPM	Linfoma de grandes células B primário mediastinal tímico
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LHC	Linfoma de Hodgkin clássico
MAL	Do inglês, <i>Myelin and lymphocyte protein</i>
MUM1	Do inglês, <i>Multiple myeloma 1</i>

NFkB	Do inglês, <i>Nuclear factor Kappa B</i>
PI-3K	Do inglês, <i>Phosphoinositide-3 Kinase</i>
PDL1	Do inglês, <i>Programmed death ligand 1</i>
QT	Quimioterapia
R-CHOP	Esquema CHOP mais Rituximabe
REAL	Do inglês, <i>Revised European-American Lymphoma Classification</i>
RT	Radioterapia
SOCS1	Do inglês, <i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>
STAT6	Do inglês, <i>Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced</i>
TMA	Do inglês, <i>Tissue micro-array</i>
TRAF1	Do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 1</i>
UNICAMP	Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas
WHO	Do inglês, <i>World Health Organization Classification of Tumours</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Aspectos gerais e históricos.....	1
1.2	Aspectos clínicos.....	3
1.3	Aspectos histopatológicos.....	4
1.4	Aspectos imuno-histoquímicos.....	5
1.5	Aspectos moleculares.....	6
1.6	Aspectos terapêuticos.....	9
1.7	Aplicabilidade dos fatores de prognósticos.....	11
1.8	Relação entre LBPM, LDGCB e LHC.....	14
2	JUSTIFICATIVA / PROPOSTA DE ESTUDO.....	18
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Gerais.....	25
3.2	Específicos.....	25
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	27
4.1	Amostra.....	27
4.2	Aspectos éticos.....	28
4.3	Crítérios de inclusão no estudo.....	28
4.4	Crítérios de exclusão do estudo.....	28
4.5	Classificação histopatológica.....	29
4.6	Construção do “Tissue Microarray”.....	29
4.7	Imuno-histoquímica.....	30
4.8	Avaliação da imuno-histoquímica.....	33
4.9	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência.....	33
4.10	Avaliação estatística.....	35
5	RESULTADOS.....	37

5.1	Variáveis clínicas e evolutivas.....	37
5.2	Variáveis anatomopatológicas	43
5.3	Variáveis imuno-histoquímicas.....	45
5.4	Avaliação de alterações no 9p por FISH.....	48
5.5	Correlações e associações estatísticas.....	49
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÕES	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de coleta de dados clínicos

Anexo 2 Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS E HISTÓRICO

Na última classificação de tumores hematopoiéticos da *World Health Organization Classification of Tumours* - WHO (JAFFE et al. 2008), o linfoma de grandes células B primário mediastinal tímico (LBPM), com codificação 9679/3, corresponde a uma entidade clinicopatológica com localização mediastinal primária e evidências de origem a partir de um linfócito B da zona medular do timo, distinguindo-se do linfoma difuso de grandes células B sistêmico sem outra especificação (LDGCB) através de características clínicas, imunofenóticas e genóticas peculiares (GAULARD et al. 2008; JOHNSON et al. 2008). Estudos recentes de expressão gênica apontam, de forma surpreendente, semelhanças entre o LBPM e o linfoma de Hodgkin clássico (LHC) (SHIPP et al. 2002; SAVAGE et al. 2003; SAVAGE 2006). Acometem preferencialmente adultos jovens (mediana de idade 35 anos), predominando no sexo feminino (2:1) e alguns estudos mostram que a sobrevida pareada por idade em 5 anos chega a 65%. O LBPM perfaz 2%-4% dos linfomas Não Hodgkin e representa cerca de 5% de todos os linfomas agressivos (CAZALS-HATEM et al. 1996; GAULARD et al. 2008; JOHNSON et al. 2008; STEIDL e GASCOYNE 2011; DABROWSKA-IWANICKA e WALEWSK 2014).

A origem a partir de uma célula B tímica para o LBPM foi baseada na localização do tumor, frequente ausência de envolvimento nodal, presença de tecido residual tímico em alguns casos e a caracterização de uma população de células B

CD21 negativas no tecido normal tímico, estas imputadas até hoje como as células originárias do LBPM (ADDIS e ISAACSON 1986; MENESTRINA et al. 1986; ISAACSON et al. 1987).

Os primeiros relatos para esta entidade datam da década de 1980, quando LICHTENSTEIN et al. (1980) descreveram alguns casos como parte de um grupo heterogêneo de linfoma primário mediastinal, incluindo, por exemplo, casos de linfoma T. Os casos eram morfológicamente descritos como de grandes células e com padrão difuso. Na época, a classificação era heterogênea sendo chamados de linfoma do centro germinativo de células clivadas e não clivadas ou linfoma centroblastico ou linfoma imunoblástico com base nas classificações de RAPPAPORT (1966), LUKES e COLLINS (1974), Kiel e da *Working Formulation* (DAVIS et al. 1990; *Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project* 1982; MARTELLI et al. 2008). Neste mesmo período, MÖLLER et al. (1986, 1987 e 1989), relataram dificuldades em enquadrar estes casos dentro de algumas destas classificações e propuseram classificá-los como linfoma de células claras primário mediastinal. Só em 1994, através da *Revised European-American Lymphoma Classification* (REAL), é que estes casos foram incluídos como um subtipo de linfoma de grandes células B, denominados linfoma de grandes células B primário mediastinal (tímico) (HARRIS et al. 1994). Em seguida, na primeira classificação de tumores hematopoiéticos da WHO em 2001 (JAFFE et al. 2001), baseada na publicação da REAL, estes foram chamados de linfoma de grandes células mediastinal (tímico), enquadrados dentro do grupo de neoplasias de células B maduras. Na última classificação da WHO 2008 (JAFFE et al. 2008), novamente o termo primário voltou a ser incluído na designação destes linfomas, demonstrando a

importância da topografia para atual classificação das neoplasias hematológicas, aliados aos achados clínicos, morfológicos, imuno-histoquímicos (IHQ) e genéticos (GAULARD et al. 2008).

1.2 ASPECTOS CLÍNICOS

Os primeiros relatos para caracterização clínica e importância topográfica no LBPM, foram feitos por MILLER et al. (1981), quando ao descreverem um grupo de 107 casos, na época, chamados de linfoma histiocítico difuso, dos quais 14 apresentavam achados histológicos predominantes de esclerose. Destes, 7 casos apresentavam comprometimento mediastinal predominante e apresentação clínica de síndrome da veia cava. A associação com esclerose correlacionou-se à resistência à radioterapia (RT) de alta voltagem e esquemas de quimioterapia (QT) na época empregados. Em seguida, TRUMP e MANN (1982), levantaram 562 casos de linfoma Não Hodgkin no período entre os anos de 1970 e 1979 procedentes do *Johns Hopkins Hospital*, Estados Unidos da América, dos quais 156 foram classificados como linfoma histiocítico difuso. Destes, apenas 11 (aproximadamente 7%) possuíam comprometimento mediastinal primário. Estes autores concluíram que o comprometimento mediastinal era incomum em pacientes com linfoma não Hodgkin quando comparado aos pacientes diagnosticados com linfoma de Hodgkin. Também concluíram que estes pacientes apresentavam um pior prognóstico, dos quais 08 dos 11 pacientes evoluíram ao óbito mesmo com estágio clínico I ou II.

Hoje este grupo designado LBPM é caracterizado por apresentar massa mediastinal anterossuperior que, quando volumosa (*bulky*), frequentemente provoca

sintomas compressivos, como a síndrome da veia cava, ou invade estruturas adjacentes como pulmão, pleura ou pericárdio. Envolvimento sistêmico, além do tórax, e estágio *Ann Arbor* III são incomuns ao diagnóstico inicial. Pode ocorrer disseminação linfonodal locorregional (supraclavicular e cervical), sendo que o acometimento da medula óssea, por definição na WHO, é ausente, com a ressalva de, que quando esta ocorre, indicar que o processo linfoproliferativo corresponde possivelmente a um LDGCB com acometimento mediastinal secundário (GAULARD et al. 2008). Outros sintomas como rouquidão, dispnéia, disfagia e insuficiência respiratória podem ocorrer (DAVIS et al. 1990; CAZALS-HATEM et al. 1996; GAULARD et al. 2008; MARTELLI et al. 2008; STEIDL e GASCOYNE 2011; DABROWSKA-IWANICKA e WALEWSK 2014).

A progressão e disseminação para outros sítios distantes, incluindo rim, adrenal, fígado ou sistema nervoso central, é relativamente comum, mas, como já mencionado, envolvimento da medula óssea e linfonodos periféricos é usualmente ausente. Recidivas, quando ocorrem, o fazem nos primeiros dois anos e tendem a ser extranodais, principalmente para o fígado, trato gastrointestinal, rins, ovários, adrenais, pâncreas e sistema nervoso central (BISHOP et al. 1999; CAZALS-HATEM et al. 1996; GAULARD et al. 2008; MARTELLI et al. 2008; DABROWSKA-IWANICKA e WALEWSK 2014).

1.3 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

O LBPM mostra variedade de apresentação morfológica. O principal achado histológico é a compartimentalização das células neoplásicas por fibras

colágenas finas, diferindo das bandas largas de colágeno encontradas no LHC, dando um aspecto alveolar à neoplasia. As células tumorais variam de medianas a grandes, com citoplasma abundante, pálido e núcleos circulares ou ovalados. Invasão vascular, remanescentes tímicos e células gigantes multinucleadas, também, podem ser observadas (GAULARD et al. 2008; MARTELLI et al. 2008). Em alguns casos, os núcleos são pleomórficos ou multilobulados lembrando uma célula de *Reed-Sternberg*, podendo levantar à suspeita morfológica de LHC (PAULLI et al. 1999; GAULARD et al. 2008). Raramente, podem apresentar-se com aspectos clínico-histológicos mesclando características tanto do LBPM como do LHC. Estes casos limítrofes primeiramente receberam a denominação de linfomas da zona cinzenta (*gray zone lymphoma*) (TRAVERSE-GLEHEN et al. 2005). Atualmente constituem uma entidade provisória denominada linfoma de células B inclassificável, com aspectos intermediários entre LDGCB e LHC (JAFFE et al. 2008).

1.4 ASPECTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

A origem do LBPM a partir de uma célula B da região medular do timo tem sido apoiada pela elevada expressão da *myelin and lymphocyte protein* (MAL) e do CD23 em cerca de 70% dos casos (COPIE-BERGMAN et al. 2002; CALAMINICI et al. 2004). O LBPM expressa marcadores antigênicos de células B como CD19, CD20, CD22, CD79a e PAX-5 e, comumente, ausência da expressão de imunoglobulinas de superfície e citoplasmáticas (GAULARD et al. 2008). Apesar da estreita relação com o timo, os marcadores de linhagem T são negativos, assim como o CD21 e moléculas de histocompatibilidade das classes I e/ou II (BARTH et al.

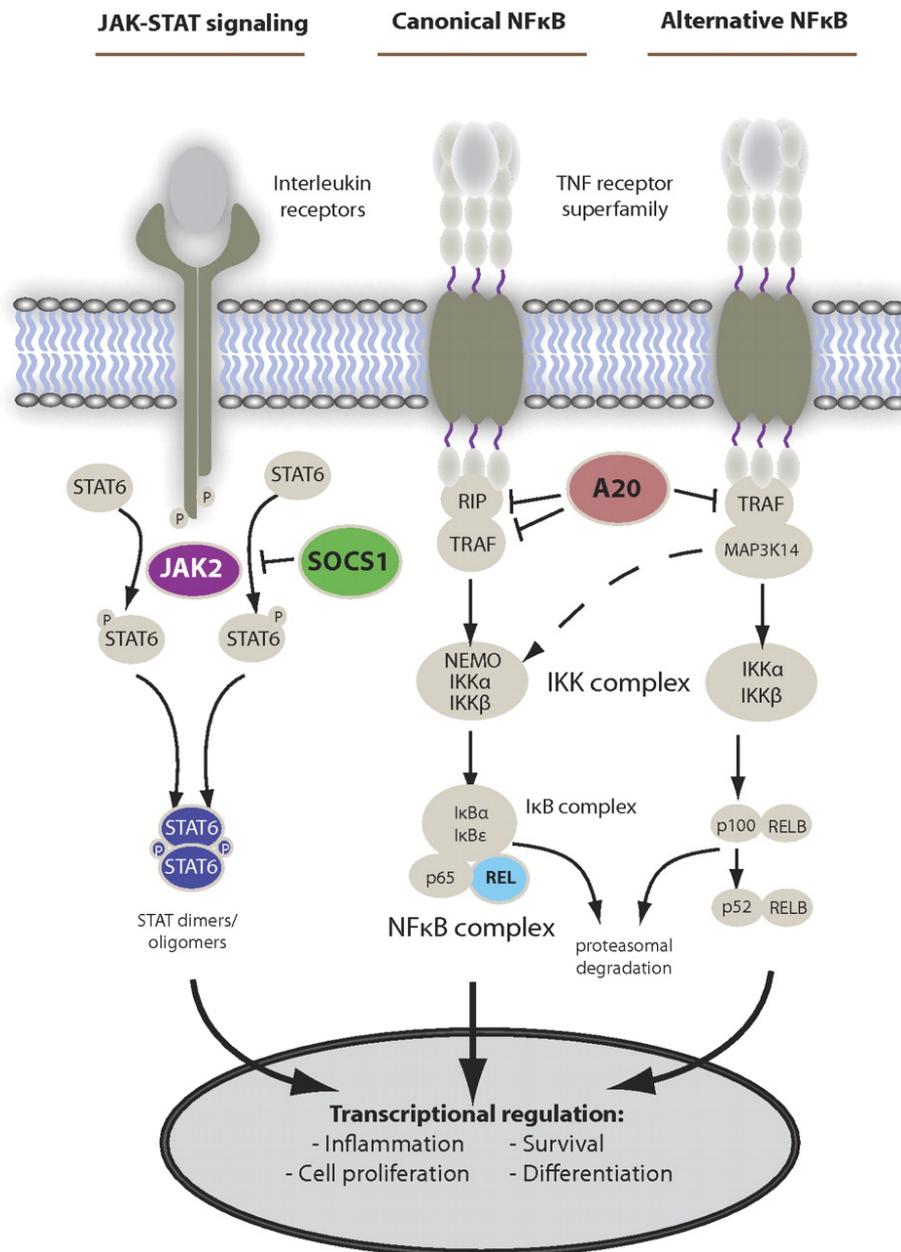
2002, STEIDL e GASCOYNE 2011). CD30 é positivo em mais de 80% dos casos, entretanto, usualmente fraco e heterogêneo, quando comparado ao LHC ou linfoma de grandes células anaplásicas, cujas expressões são fortes e homogêneas (VAN BESIEN et al. 2001; PILERI et al. 2003). O CD15 pode ocasionalmente ser expresso. Frequentemente há positividade para *interferon regulatory factor 4 / multiple myeloma 1* (IRF4 / MUM1) em 75% dos casos, havendo expressão variável de 55% a 80% para o *B-cell CLL/lymphoma 2* (Bcl-2), de 45% a 100% para o *B-cell lymphoma 6 protein* (Bcl-6) e menor expressão para o CD10 (cerca de 8% a 32%). A baixa expressão de CD10 e ausência de CD21 podem ser um indicativo de origem pós-centro germinativo para esta neoplasia (PILERI et al. 2003; CALAMINICI et al. 2004; MALPELI et al. 2004; IQBAL et al. 2007; DUNPHY et al. 2008).

1.5 ASPECTOS MOLECULARES

O LBPM é caracterizado por alterações genéticas específicas, sendo algumas delas reconhecidas como marcadores desta entidade (Quadro 1). As alterações frequentemente observadas estão relacionadas a ganhos de material cromossomal, achado incomum em outros linfomas que se relacionam a perdas (DE LEEUW et al. 2004). Em mais de 70% dos casos há comprovação de ganhos nos braços curtos dos cromossomos 9 e 2 (JOOS et al. 1996; BENTZ et al. 2001; BEA et al. 2005, SAVAGE 2006; STEIDL e GASCOYNE 2011). Pesquisas de potenciais genes localizados nesta região do cromossomo 9 e relacionados a patogênese, mostram uma superexpressão de genes como *Janus Kinase 2* (JAK2) e *Lysine-specific demethylase 4C* (JMJD2c). Estes, ativam a via JAK-STAT, que estimula

sobrevivência, proliferação celular e a supressão de SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling 1*) (FIGURA 1) (JOOS et al. 1996; BENTZ et al. 2001; SAVAGE 2006; KIMM et al. 2007; STEIDL e GASCOYNE 2011). Os genes p16 e p15 também estão localizados no cromossomo 9p21, sendo estes, depois do p53, uns dos mais frequentes genes alterados nos cânceres humano (SÁNCHEZ-BEATO et al. 2001 e 2003). Rearranjos dos genes Bcl-2, Bcl-6 e Myc são ausentes ou raros e há comprovação molecular para alterações em genes relacionados ao ciclo e proliferação celular em cerca de 30% dos pacientes com LBPM (SCARPA et al. 1999; SCARPA et al. 2001).

Já no cromossomo 2, RODIG et al. (2007) demonstraram amplificação do proto-oncogene REL. Este, faz parte de uma classe de proteínas de transcrição gênica, compondo subunidades de fatores de transcrição que se ligam a sequências gênicas envolvidas com a diferenciação de células B. Rearranjo ou superexpressão de c-REL podem levar à tumorigênese, sendo este um dos possíveis candidatos envolvidos na gênese dos LBPM. O trabalho mostrou, ainda, maior expressão do *Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 1* (TRAF1) em LBPM, quando comparado ao LDGCB nodal. A expressão IHQ de c-REL e TRAF1 pode distinguir o LBPM dos demais LDGCB com sensibilidade de mais de 98%.



Fonte: STEIDL e GASCOYNE (2011)

Figura 1 - As duas principais vias de sinalização (JAK-STAT e NFκ-B) alteradas no LBPM.

Quadro 1 - Relação dos genes alterados envolvidos na patogênese do LBPM.

GENE	VIA / FUNÇÃO	FREQUÊNCIAS NO LBPM (%)
Ganho no número de cópias		
REL	Via NFκB	75
PDL1/PDL2	Altera microambiente tumoral / apoptose	63
JAK2	Via JAK-STAT / Modificação de histonas	63
JMJD2C	Modificação de histonas	63
Translocações cromossômicas / rearranjos		
CIITA	Regulação da transcrição do HLA de classe II / Apresentação de antígenos	38
Mutação na sequência de codificação		
SOCS1	Interleucina / Via JAK-STAT	45
STAT6	Interleucina / Via JAK-STAT	36
TNFAIP3	Via NFκB	36
MYC	Regulação transcricional / remodelamento da cromatina	25
TP53	Via p53	13
Promotor de hipermetilação		
p16/INK	Progressão do ciclo celular / Via p53	9

Fonte: Adaptado de STEIDL e GASCOYNE (2011)

1.6 ASPECTOS TERAPÊUTICOS

Ensaio clínico prospectivos específicos para LBPM são escassos na literatura, por um lado pelo pequeno número de pacientes e, por outro, pelo relativo recente reconhecimento do LBPM como uma entidade distinta (STEIDL e GASCOYNE 2011). Portanto, a maioria das recomendações de tratamento é baseada em estudos retrospectivos ou análises de subgrupos de ensaios randomizados de LDGCB. A terapia inicial é crítica no tratamento do LBPM, sendo que as terapias de

resgate para recorrências ou progressão são de eficácia limitada, tornando imperativo tentar a cura, quando possível, com o primeiro esquema terapêutico utilizado (JOHNSON et al. 2008; MELLO 2010).

As modalidades terapêuticas empregadas para o LBPM são a QT, RT e QT de altas doses com transplante de medula óssea, sendo que a taxa média de sobrevida em 5 anos é referida em alguns estudos como superior a 70%. Antes da era Rituximabe, o esquema de QT mais amplamente empregado era composto por *Cyclophosphamide-hydroxydaunomycin- (Oncovin) Vincristine-prednisone (CHOP)* ou CHOP-símiles, ditos esquemas de primeira geração. As taxas de sobrevida livre de progressão eram abaixo do ideal com números variando de 38-52% (NGUYEN et al. 2000; ZINZANI et al. 2002; HAMLIN et al. 2005). Foram testados também esquemas de segunda / terceira geração como o VACOP-B (*etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, and bleomycin*) e o ProMACE-CytaBOM (*cyclophosphamide, doxorubicin, etoposide cytozar, bleomycin, vincristine, methotrexate and prednisone*), bem como quimioterapia de altas doses com transplante autólogo de medula óssea, com resultados superiores ao CHOP (ZINZANI et al. 1999, 2001, 2002 e 2009; CAIROLI et al. 2002).

O uso do Rituximabe aumentou significativamente as taxas de resposta e sobrevida nos pacientes com LDGCB, CD20-positivos (FEUGIER et al. 2005; DABROWSKA-IWANICKA e WALEWSK 2014). Em trabalho publicado pelo *Mabthera International Trial Group Study*, também, demonstrou-se benefícios no uso do Rituximabe com CHOP (R-CHOP) para o tratamento do LBPM. O estudo mostrou aumento na taxa de remissão de 54% para 80% ($P = 0,015$) e diminuição da progressão de doença de 24% para 2,5% ($P < 0.001$), demonstrando que este

esquema é também efetivo para o LBPM (RIEGER et al. 2011). Apesar dos avanços com uso do R-CHOP 20-30% dos pacientes ainda evoluem com progressão ou recaída, muitos necessitando consolidar a lesão residual com esquemas de RT (VASSILAKOPOULOS et al. 2012; XU et al. 2013). Estudos mostram que a associação do Rituximabe com esquemas de segunda / terceira geração, isolado ou associado à RT, não se mostrou mais eficaz quando comparada ao R-CHOP (ZINZANI et al. 2009; VASSILAKOPOULOS et al. 2012).

O emprego da RT é controverso no LBPM, tanto por aumentar os riscos de toxicidade cardíaca como pela possibilidade de induzir câncer mamário secundário, sobretudo em pacientes jovens (NIEDER et al. 2007; HENDERSON et al. 2010). Para minimizar estes efeitos, recente estudo com grupo prospectivo de fase II obteve drástica redução do uso da RT (4%) em 51 pacientes tratados com *Dose adjusted etoposide, prednisone, (Oncovin) vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin – Rituximab* (DA-EPOCH-R). O tratamento se mostrou seguro com índices de toxicidade comparável ao R-CHOP (DUNLEAVY et al. 2013). Outros autores relatam segurança e eficácia na utilização do DA-EPOCH-R em crianças e adolescentes (WOESSMANN et al. 2013).

1.7 APLICABILIDADE DOS FATORES DE PROGNÓSTICO

Na intenção de uniformizar e melhorar os múltiplos índices de prognósticos existentes, investigadores de 16 instituições e grupos cooperativos da Europa, EUA e Canadá, uniram-se no *Internacional Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project* e criaram o Índice Prognóstico Internacional (IPI). Esta, até o momento, é a

ferramenta clínica mais importante para predizer prognóstico no LDGCB, ao separar pacientes em subgrupos distintos. O IPI clássico separa os doentes em pacientes com baixo risco (0 ou 1 fator), risco intermediário baixo (2 fatores), risco intermediário alto (3 fatores) e alto risco (4 ou 5 fatores), sendo a sobrevida global em 5 anos de 73%, 51%, 43% e 26%, respectivamente (Anonymous 1993; SHIPP et al. 2002). (Quadro 2).

Quadro 2 - Índice de Prognóstico Internacional (IPI) e variantes.

Grupo de Risco	Núm. de Fatores de Risco	Fatores de Risco
IPI CLÁSSICO		
Baixo	0-1	Idade >60 anos ECOG > 2
Intermédio-baixo	2	Estádio III - IV
Intermédio-alto	3	LDH sérica alterada
Alto	4-5	Doença extra-ganglionar em > 1 local
<i>Doentes < 60 anos</i>		
Baixo	0	ECOG > 2
Intermédio-baixo	1	Estádio III - IV
Intermédio-alto	2	DHL sérica alterada
Alto	3	
VERSÃO REVISADA PARA R-CHOP (R-IPI)		
Muito bom	0	Idade > 60 anos ECOG > 2
Bom	1-2	Estádio III - IV
Pobre	3-4-5	DHL sérica alterada Doença extra-ganglionar em > 1 local

Fonte: Adaptado de Anonymous (1993) e SEHN et al. (2007).

Outra maneira de estratificar grupos prognósticos é através de estudos moleculares. Neste contexto, para o LDGCB, há uma consolidada subdivisão molecular em um grupo com expressão gênica características de células B do centro

germinativo (CG); outro com expressão gênica de linfócitos B ativados ou pós-centro germinativo (LA); e um terceiro grupo considerado não classificável. Esta divisão mostrou ter valor prognóstico, onde casos classificados como CG apresentaram sobrevida de 76% em relação aos LA (16% - $p < 0,001$) (ALIZADEH et al. 2000).

Contudo, a aplicabilidade de técnicas moleculares é dispendiosa e limitada, ou mesmo inexistente, em muitos centros. No intuito de reproduzir a classificação molecular, muitos trabalhos tentam formular algoritmos de marcadores IHQ. Como conveniência, teríamos o baixo custo e a facilidade de utilizar amostras fixadas em formol e conservadas em blocos de parafina. Entretanto esta tentativa de classificação IHQ é ainda controversa e pouco reprodutível (COLOMO et al. 2003; HANS et al. 2004; HAARER et al. 2006; AMEN et al. 2007; NATKUNAM et al. 2008; CHOI et al. 2009). Tem-se atribuído o insucesso a divergências inter-observador / inter-laboratorial, à utilização de grupos de pacientes heterogêneos e, principalmente, ao advento do Rituximabe ao tratamento (NYMAN et al. 2007; WILSON et al. 2008; OTT et al. 2010).

Já para o LBPM, os fatores de prognóstico ainda não foram bem estabelecidos. Aqui o IPI (bem utilizado no LDGCB) nem sempre fornece informações prognósticas precisas. Por exemplo, alguns casos possuem extenso envolvimento de estruturas intratorácicas ao diagnóstico, tornando difícil, às vezes impossível, diferenciar entre os estádios II ou IV pelo sistema de Ann Arbor (ZINZANI et al. 2001). Contudo, alguns trabalhos recentes referem que estágio alto (III ou IV) e presença de derrames pericárdico ou pleural relacionam-se a pior prognóstico e menor resposta terapêutica (DUNLEAVY et al. 2013; AOKI et al. 2014).

Para análise molecular, um dos poucos trabalhos que tentam criar critérios preditivos para LBPM em relação a outros linfomas que acometem o mediastino, ROSENWALD et al. (2003) utilizando *Lymphochip de cDNA microarray*, encontraram 35 genes mais expressos nos LBPM e 11 genes mais expressos nos LDGCB, montando um modelo preditor. Os resultados encontrados, no LBPM, eram de pacientes mais jovens, predominando o sexo feminino e com sobrevida em 5 anos de 64%, superior aos 46% do LDGCB ($p=0,0067$). Quando o LDGCB foi subdividido em tipo LA e tipo CG, a sobrevida em 5 anos para o LBPM foi semelhante ao CG (64%) em relação ao LA (59%).

Para avaliação IHQ, há poucos trabalhos relacionados. No algoritmo IHQ proposto por CHOI et al. (2009), o LBPM possui um perfil semelhante ao grupo CG do LDGCB, corroborando os achados moleculares de ROSENWALD et al. (2003). Em uma casuística nacional, demonstrou-se, em análise multivariada, que a expressão de MUM1 correlacionou-se a um prognóstico desfavorável e menor sobrevida global no LBPM, já que pacientes com expressão IHQ de MUM1 tiveram quase 4 vezes maior risco de morte em comparação aos negativos. O mesmo trabalho também mostrou que a classificação IHQ em CG e LA não se correlacionou ao prognóstico para os casos de LBPM estudados (MELLO 2010; DE MELLO et al. 2011).

1.8 RELAÇÃO ENTRE LBPM, LDGCB E LHC

O LBPM possui características moleculares que o distingue dos demais linfomas (amplificação da região cromossômica 9p24, expressão de FIG e MAL). Ao

mesmo tempo, estudos comparativos de expressão gênica entre LBPM, LDGCB e o LHC acometendo o mediastino, têm demonstrado maior semelhança entre o LBPM e o LHC (SHIPP et al. 2002; ROSENWALD et al. 2003; SAVAGE et al. 2003; TRAVERSE-GLEHEN et al. 2005; JAFFE et al. 2008).

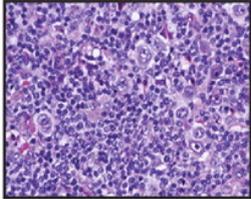
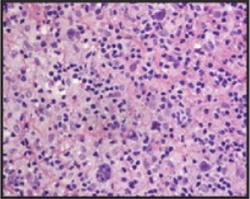
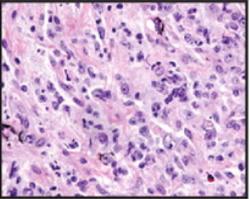
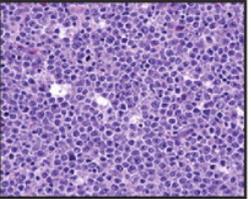
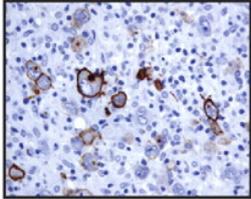
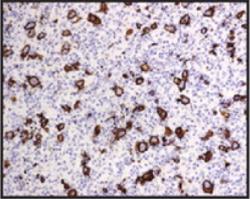
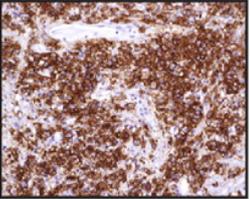
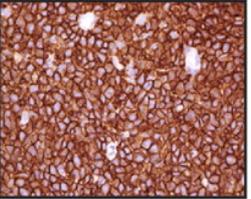
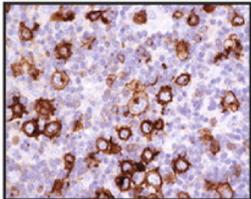
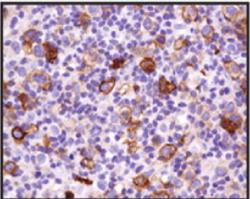
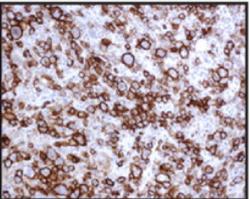
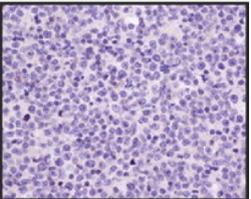
As principais semelhanças descritas são:

- 1 Baixa expressão de componentes do receptor de células B (*B cell receptor*) e ausência de IgM de superfície;
- 2 Baixa expressão de alvos moleculares da enzima fosfatidilinositol-3 quinase (PI-3K), incluindo a *protein kinase B* (AKT) e *forkhead box P1* (FOXP1);
- 3 Elevada expressão de componentes da via das citocinas (fator de necrose tumoral);
- 4 Elevada expressão do receptor alfa 1 da interleucina 13 e *nuclear fator Kappa B* (NFkB) (PILERI et al. 2003; ROSENWALD et al. 2003; SAVAGE et al. 2003; CALVO et al. 2004).

Estas concordâncias sugerem sobreposição entre os mecanismos envolvidos na patogênese destas duas entidades e que ativação da via NFkB confere vantagem de proliferação e sobrevivência para as células neoplásicas (SAVAGE et al. 2003).

Outros trabalhos defendem que LBPM e LHC representariam entidades distintas em extremos opostos de um espectro de evolução biológica. Linfomas *gray zone* do mediastino, atualmente, constituindo na WHO uma entidade provisória chamada de linfoma de células B inclassificável com aspectos intermediários entre LDGCB e LHC, seriam a parte intermediária deste espectro compartilhando características de ambos (CALVO et al. 2004; TRAVERSE-GLEHEN et al. 2005; GAULARD et al. 2008; JAFFE et al. 2008).

Na prática, muitos casos compartilham achados clínicos, histológicos e IHQ semelhantes, tornando o diagnóstico diferencial entre estas entidades difícil (Figura 2). Não obstante, sabemos a importância de um diagnóstico preciso já que representam subtipos de linfomas com prognósticos e estratégias terapêuticas distintas. Portanto, embora muitos dos mecanismos propostos até o momento tenham ajudado a compreender a gênese do LBPM, ainda há muitos eventos por serem entendidos na relação deste com o LDGCB e LHC, sendo que estudos que busquem a caracterização de novos marcadores poderão ajudar o diagnóstico diferencial e a estratificação de pacientes em grupos distintos de prognóstico e resposta terapêutica.

	Nodular sclerosis Hodgkin lymphoma	Mediastinal gray zone lymphoma	Primary mediastinal B cell lymphoma	Diffuse large B cell lymphoma
Pathological features				
Hematoxylin and Eosin				
CD20				
CD30				
Clinical features				
Approximate median age	30 years	30 years	35 years	65 years
Gender predominance	female	male > female	female	male ≥ female
Typical manifestation	supraclavicular LN / mediastinal	mediastinal	mediastinal / supraclavicular LN	nodal
Bone marrow involvement	uncommon	rare	rare	16%

Fonte: STEIDL e GASCOYNE (2011)

Figura 2 - Aspectos clínicos, epidemiológicos, histológicos e IHQ dos diagnósticos diferenciais de processos linfoproliferativos que acometem o mediastino.

2 JUSTIFICATIVA / PROPOSTA DE ESTUDO

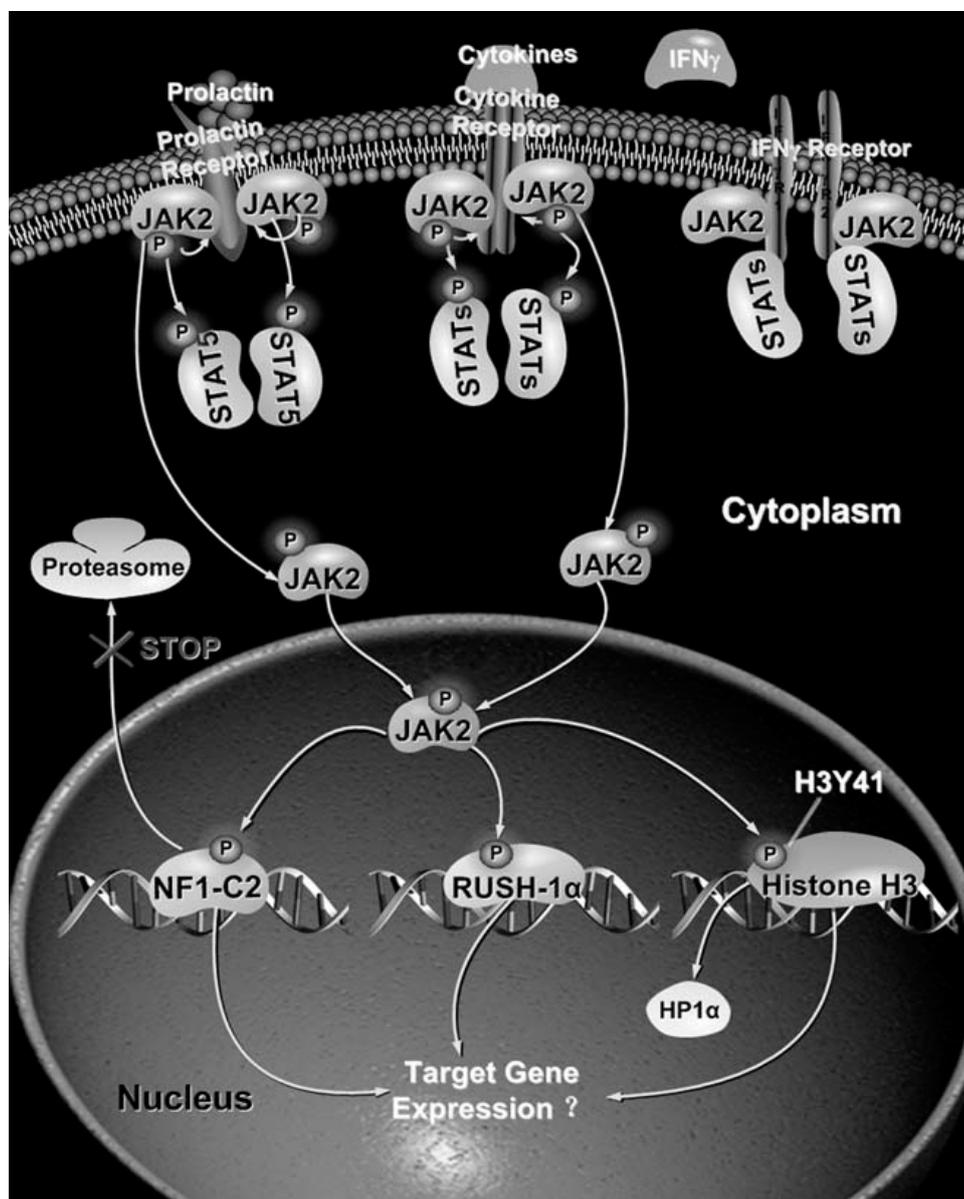
A caracterização do LBPM como uma entidade isolada, as falhas na utilização do IPI para este grupo, uma assinatura molecular própria, características clínico-histológicas que os diferem do LDGCB e a dificuldade no diagnóstico diferencial dos linfomas que acometem o mediastino, justificam a necessidade de novos estudos que busquem validar achados já descritos e/ou encontrar novos marcadores que possam se correlacionar a fatores prognósticos em pacientes com LBPM. Estes marcadores poderão otimizar o manejo clínico através da estratificação de possíveis grupos prognósticos e/ou constituírem possíveis alvos terapêuticos.

Neste contexto, destacamos os achados de ganhos relacionados ao braço curto do cromossomo 9, identificados em cerca de 75% dos casos de LBPM através de testes moleculares, e consequente ativação da via JAK-STAT, que favorece sobrevivência e proliferação celular (BENTZ et al. 2001; LENZ et al. 2008; STEIDL e GASCOYNE 2011). Dos genes recentemente imputados à patogênese do LBPM (Quadro 1), selecionamos cinco deles para avaliarmos a expressão proteica por IHQ nos casos selecionados. Três destes genes (JAK2, PDL1 e JMJD2c) estão localizados na região 9p, o que justifica a escolha. Além disso, o JAK2 e o PDL1 são considerados potenciais alvos terapêuticos e de relevante interesse. Apesar de não se localizarem na região 9p, escolhemos os dois outros genes (STAT6 e SOCS1) por desempenharem funções relacionadas a via JAK-STAT (Figura 1). Resumidamente estes cinco genes são caracterizados:

- 1) **JAK2:** Um dos membros da família *Janus Kinase*, corresponde a uma tirosina quinase ancorada à membrana capaz de ativar diversos fatores de transcrição da família STAT envolvidos nos mecanismos de apoptose, angiogênese, crescimento e diferenciação celular (AARONSON et al. 2002). Alterações neste gene têm sido demonstradas e associadas a possível via de terapia alvo em LBPM (TWA et al. 2014). A via canônica pela qual estas ativações ocorrem, chamada via JAK-STAT (Figura 1), tem sido apontada na patogênese de múltiplas neoplasias, inclusive linfoides (YU et al. 2009). Muitos estudos também demonstram uma via alternativa, onde o JAK2 atua diretamente no núcleo ativando progressão do ciclo celular, apoptose e instabilidade genética (Figura 3) (DAWSON et al. 2011; QIAN et al. 2011; ZOUENIN et al. 2011; SEDEK e STROUS et al. 2013; JAY et al. 2015). Esta via independente de STAT interage com outras vias de sinalização, inclusive a NFK-B, e tem sido associada com uma possível função supressora tumoral do JAK2 (NILSSON et al. 2010; QIAN et al. 2011).
- 2) **PDL1:** *Programmed death ligand 1* também conhecido como *cluster of differentiation 274* (CD274), é uma proteína transmembrana à qual se atribui um papel de supressão do sistema imune, por diminuir a proliferação de linfócitos T CD8⁺ por exaustão. Esta diminuição se daria por estímulo da apoptose, através da supressão de BCL2 nos linfócitos T. Em células neoplásicas, a hiperativação do PDL1 conferiria um mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro, gerando vantagens no processo de evolução clonal (CHEMNITZ et al. 2004). (Figura 4). Alterações neste gene também

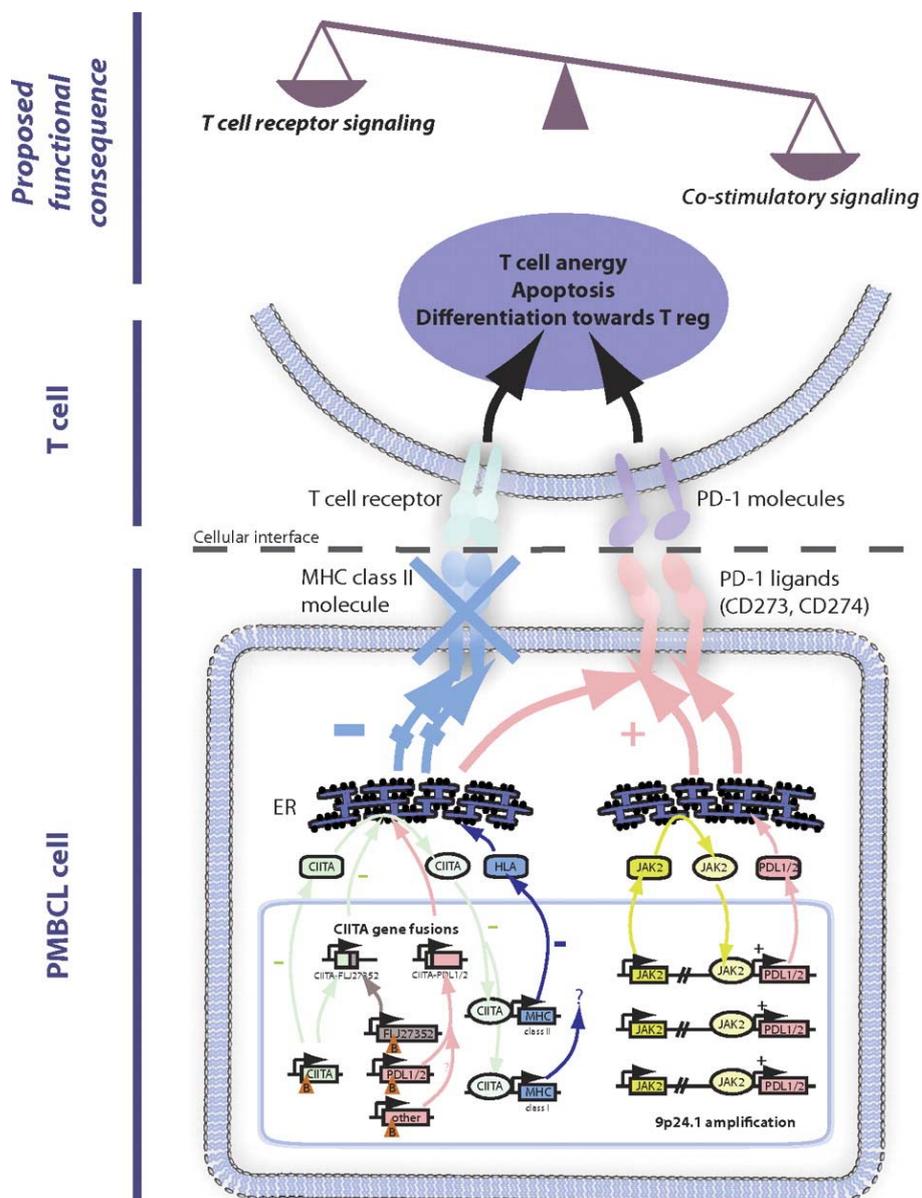
têm sido demonstradas e associadas a possível via de terapia alvo em LBPM (TWA et al. 2014);

- 3) **JMJD2c:** Membro da família *Jumonji domain 2*, que, juntamente com o JAK2, é relacionada a fenômenos de metilação da histona 3 e ativação da cromatina. Distúrbios neste mecanismo são associados à proliferação e à sobrevivência tumoral. *In vitro*, estes achados foram frequentes em linhagens celulares de modelos de LBPM e LH com ampliações do 9p e ausentes nas linhagens de LDGCB sem amplificação 9p, destacando a especificidade desta observação associada à superexpressão tanto do JMJD2c como de JAK2 (RUI et al. 2010);
- 4) **STAT6:** *Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced*, localizado no cromossomo 12q, cuja ativação constitutiva está associada a um fenótipo maligno ou identificada como uma alteração característica do LBPM, quando comparado ao LDGCB (RITZ et al. 2009);
- 5) **SOCS1:** *Suppressor of cytokine signaling 1*, localizado no cromossomo 16p, tem como função bloquear a sinalização induzida por citocinas através de um mecanismo de *feedback* negativo na via JAK-STAT. Estudos relatam que alterações neste gene associam-se à função supressora tumoral no contexto do LBPM (MELZNER et al. 2005).



Fonte: QIAN (2011)

Figura 3 – Via JAK-nuclear.



Fonte: STEIDL e GASCOYNE (2011)

Figura 4 - Impacto das alterações genéticas ao microambiente tumoral.

Como principal consequência da ativação da via JAK-STAT, temos o estímulo à proliferação e diferenciação celular - passagem da fase G1 para fase S, pela interação das ciclinas (Figura 5). A desorganização dos mecanismos que controlam a proliferação celular é característica comum a todos os tipos de tumores. Isso deve-se em grande parte a desregulação das vias de controle do ciclo celular pRb/p16^{INK4A} e p53/p21. Em células normais, uma complexa rede de sinalização modula a formação e atividade dos complexos ciclina-CDK (Figura 6). Estes mecanismos funcionam como um relógio que controla a passagem pelas fases G1, S, G2 e M. Alterações neste controle é um passo essencial à oncogênese (SÁNCHEZ-BEATO et al. 2003; FRITZ e FAJAS 2010).

Portanto, propomos avaliar a expressão proteica de alguns genes recentemente implicados na patogênese do LBPM, bem como correlacioná-los à expressão de proteínas relacionadas ao ciclo e à proliferação celular, visto que uma das principais consequências dos mecanismos mencionados, sobretudo ativação da via JAK-STAT, é o estímulo à proliferação e diferenciação celular (WALZ et al. 2006) (Figuras 5 e 6).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAIS

Avaliar a relação entre alterações no braço curto do cromossomo 9 e a expressão de proteínas relacionadas a essa região e distais, entre si e testar a associação destas com achados clínicos, evolutivos, terapêuticos e patológicos em casos de LBPM.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os achados clínicos, evolutivos, terapêuticos e patológicos;
- Avaliar de maneira indireta a ocorrência de alterações citogenéticas relacionadas ao braço curto do cromossomo 9, pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) nesses casos;
- Avaliar a expressão proteica, através de IHQ, de genes recentemente imputados na patogênese do LBPM (JMJD2c, SOCS1, STAT6, JAK2 e PDL1) (Quadro 1) e de marcadores relacionados à proliferação e ao ciclo celular;
- Correlacionar os achados de FISH e IHQ com parâmetros clínicos, evolutivos, terapêuticos e patológicos dos casos levantados (vide algoritmo proposto na Figura 7).

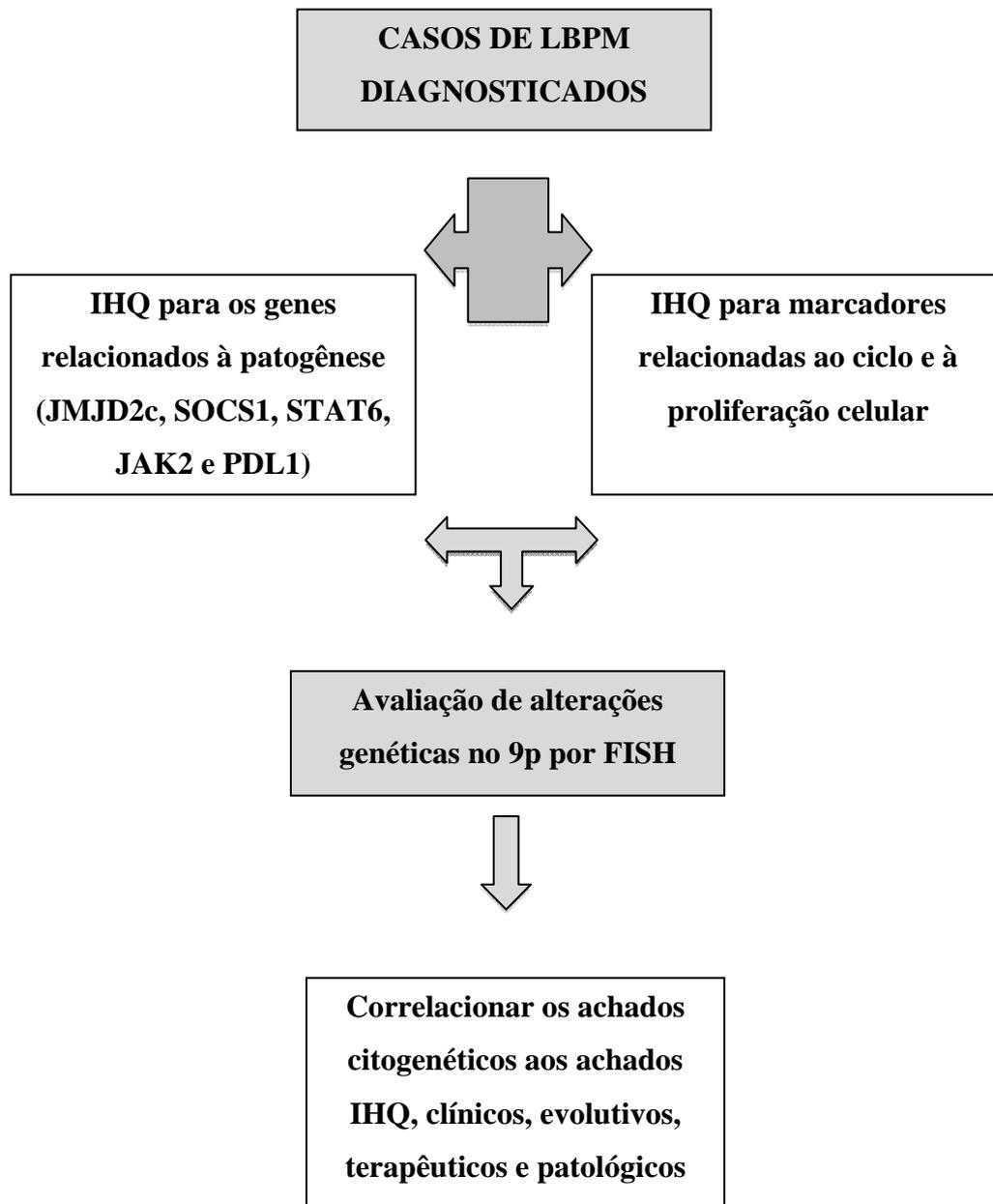


Figura 7 - Algoritmo do estudo.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Foram levantados retrospectivamente 88 casos diagnosticados como linfoma de grandes células com imunofenótipo B e topografia mediastinal dos anos de 1975 a 2011 procedentes de cinco instituições do Estado de São Paulo: A.C. Camargo Cancer Center (ACCCC); Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP); Hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (HSCSP) e Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII (HCB).

Os dados clínicos, evolutivos e terapêuticos foram obtidos dos prontuários médicos de cada paciente existentes nos serviços de arquivos médicos das instituições envolvidas. As informações coletadas foram anotadas na ficha de coleta de dados utilizada no estudo (Anexo 1). Para os casos que dispunham de tecido fixado em formol embebidos em parafina, estes foram obtidos nos arquivos dos departamentos de anatomia patológica de cada instituição. Os aspectos histopatológicos, bem como a avaliação das reações IHQ de cada caso, foram avaliados simultaneamente em um microscópio de duas cabeças por dois patologistas (CAMS e JV). Para avaliação do IPI, utilizaram-se os critérios clássicos independentemente das idades (Quadro 2). Os dados obtidos (clínicos, evolutivos,

terapêuticos, IHQ e FISH) foram tabulados em uma planilha do Excel (*Windows*) para, em seguida, serem submetidas aos testes estatísticos.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo/Fundação Antônio Prudente, obtendo a aprovação com número de protocolo 1552 / 11 em 20/10/2011 (Anexo 2). Nas demais instituições, os respectivos Comitês de Ética aprovaram a participação no estudo.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NO ESTUDO

Foram incluídos no estudo pacientes com linfoma de grandes células na topografia mediastinal primária e com imunofenótipo B, de qualquer idade ou gênero, diagnosticados nas instituições participantes entre 1975 e 2011.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DO ESTUDO

Foram excluídos os casos em que os blocos de parafina não estavam disponíveis ou não continham material suficiente para as análises IHQ propostas. Os casos com material suficiente, mas dados clínicos mínimos nos prontuários avaliados, foram excluídos das análises estatísticas clínicas e correlação evolutiva. Pacientes que possuíam infiltração da medula óssea ao diagnóstico, também foram excluídos do estudo.

4.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Foi considerado diagnóstico de LBPM, casos que preencheram critérios histológicos e IHQ descritos por GAULARD et al. (2008). Todos os casos cedidos do HCB e HCFMUSP, cerca da metade dos casos do ACCCC e alguns casos da UNICAMP e HSCSP, foram procedentes de uma outra tese realizada no ACCCC (MOREIRA 2012). Nestes estão incluídos os casos mais antigos cujas as classificações / revisões foram feitas por um Hematopatologista (JV). Para os demais casos (mais recentes), as lâminas histológicas coradas pela Hematoxilina e Eosina, bem como as dos marcadores IHQ existentes foram revisadas em um microscópio óptico de duas cabeças, marca *Olympus*® modelo BX53, por dois patologistas (CAMS e JV). Para os casos com marcadores IHQ insuficientes ou inexistentes, utilizou-se o painel IHQ rotineiro para o diagnóstico de linfomas de grandes células do Departamento de Anatomia Patológica do ACCCC.

4.6 CONSTRUÇÃO DO *TISSUE MICROARRAY*

A confecção do TMA foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica do ACCCC, utilizando o equipamento *Manual Tissue Arrayer 1* (*Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA*). Foram selecionadas duas áreas (*spots*) nos preparados corados com hematoxilina e eosina, representativas de tumor, evitando-se áreas de necrose e fibrose, com diâmetro de 1,5mm. Após a confecção do TMA, procedeu-se cortes histológicos com espessura de 3 micrômetros, pescadas em lâminas silanizadas (*Starfrost*®), recobertas com adesivo

e submetidas à fixação por UV (*Instrumedics Inc*®, *Hackensack*, NJ, EUA). Estas lâminas, posteriormente, passaram por um banho de parafina e foram armazenadas em freezer a - 20 °C, até o momento do uso para as reações de IHQ.

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para os marcadores IHQ relacionados ao ciclo e proliferação celular, foram utilizados os anticorpos especificados no Quadro 3. Para os marcadores relacionados à patogênese do LBPM foram utilizados os seguintes anticorpos: **JMJD2c** (KDM4C / GASC1 / JMJD2C); **SOCS1**; **STAT6**; **JAK2** e **PDL1** (CD274). As especificações técnicas destes marcadores estão no QUADRO 4. Dentro do protocolo utilizado para este grupo, foi utilizado o *kit Novolink Polymer Detection Systems* (*Leica Biosystems*™), sendo, a seguir, os passos do protocolo:

- 3 banhos de 5' no xilol;
- 2 banhos de 2' no etanol 100%;
- Deixar lâminas em água corrente por 5';
- Recuperação antigênica;
- Deixar lâminas em água corrente por 5';
- 2 banhos de 5' em água oxigenada (bloqueio da peroxidase);
- 2 banhos de 5' em tampão PBS 1x;
- Secar excesso de tampão, aplicar 100uL de *PROTEIN BLOCK* e deixar lâminas incubando em câmara úmida por 20';
- 2 banhos de 5' em tampão PBS 1x;

- Secar excesso de tampão, aplicar 100uL de anticorpo em cada lâmina e deixar incubando em câmara úmida por 1h;
- 2 banhos de 5' em tampão PBS 1x;
- Secar excesso de tampão, aplicar 100uL de *post primary* e deixar lâminas incubando em câmara úmida por 30';
- 2 banhos de 5' em tampão PBS 1x;
- Secar excesso de tampão, aplicar 100uL de *polymer* e deixar lâminas incubando em câmara úmida por 30';
- 2 banhos de 5' em tampão PBS 1x;
- Secar excesso de tampão, aplicar 100uL de DAB (1/20) e deixar lâminas incubando em câmara úmida por 5';
- Deixar lâminas em água corrente por 5';
- Mergulhar lâminas na hematoxilina por 2';
- Retirar excesso de hematoxilina e mergulhar lâminas 2x rapidamente no diferenciador;
- Deixar lâminas em água corrente por 5';
- 2 banhos de 2' no etanol 100%;
- 3 banhos de 5' no xilol;
- Montar lâminas.

Quadro 3 - Especificações técnicas dos marcadores IHQ relacionados ao ciclo e proliferação celular.

Anticorpo	Clone	Título	Fabricante
Ki67	Mib-1	1:400	Dako cat# M7240, Glostrup, Dinamarca
Ciclina D3	DCS-22	1:50	Neomarkers cat# MS215
Ciclina E (M20)	policlonal em coelho	1:30	Santa Cruz cat# sc481, Santa Cruz, CA, EUA
Ciclina D1	SP4	1:50	Dako cat# M3635, Glostrup, Dinamarca
Ciclina D2	Policlonal	1:100	Bioss (bs-1148R)
p15	15P06	1:200	Neomarkers cat# MS1053
p16	EPR1473	1:50	Abcam® (ab108349), Cambridge, MA, EUA
p21 ^{waf1/cip1}	Sx118	1:50	Dako cat# M7202
p27	SxS3	1:200	Dako Cat# M7203
p53	DO-7	1:300	Dako cat# M7001
p63	4A4	Pré-diluído	Ventana
Topoisomerase IIa	SWT3D1	1:800	Dako cat# M7186
MDM2	SMP14	1:50	Abcam® (ab3110), Cambridge, MA, EUA

Quadro 4 - Especificações técnicas dos marcadores IHQ relacionados a patogênese do LBPM.

Anticorpo	Clone	Título	PH	Recuperação	Padrão de marcação	Fabricante
SOCS1	Policlonal	1:350	9.0	Automatizado*	Núcleo e Citoplasma	Abcam® (ab62584), Cambridge, MA, EUA
PDL1	Policlonal	1:100	9.0	Automatizado*	Membrana e citoplasma	Abcam® (ab58810), Cambridge, MA, EUA
JMJD2C	Policlonal	1:200	9.0	Automatizado*	Núcleo	Abcam® (ab85454), Cambridge, MA, EUA
STAT6	Policlonal	1:25	9.0	Automatizado*	Núcleo e citoplasma	Abcam® (ab44718), Cambridge, MA, EUA
JAK2	Policlonal	1:100	9.0	Automatizado*	Núcleo e citoplasma	Abcam® (ab39636), Cambridge, MA, EUA

* Ventana® / protocolo usando 60' de recuperação antigênica com CCI e 1h de incubação do anticorpo.

4.8 AVALIAÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Adaptado de ALLRED (2010), avaliamos, de maneira semi-quantitativa, em cada *spot* do TMA ou corte inteiro a relação células positivas/células tumorais totais em 5 campos de grande aumento (objetiva de 40x). Em seguida, tabulamos na ficha de coleta de dados e na planilha do Excel a intensidade (0= ausente 1= fraco; 2= moderado; 3= intensa) bem como a porcentagem da reatividade células positivas / células tumorais (0= 0%; 1= <5%; 2= 5 a 10%; 3= 11 a 50%; 4= > 50%) para cada marcador. A interpretação final para a positividade das reações IHQ, foi baseada na somatória entre a pontuação obtida na intensidade e a pontuação obtida na porcentagem da reação, conforme exposto no Quadro 5.

Quadro 5 - Método semi-quantitativo empregado para avaliação da positividade das reações IHQ.

Intensidade da reação	Porcentagem da reação	Somatória	Resultado
0 (ausente)	0 (0%)	0	NEGATIVO
1 (fraca)	1 (<5%)	2	
2 (moderada)	2 (5 a 10%)	3	
3 (intensa)	3 (11 a 50%)	4	POSITIVO
	4 (> 50%)	5	
		6	
		7	

4.9 HIBRIDIZAÇÃO *in situ* POR FLUORESCÊNCIA

De forma indireta, avaliamos, pela técnica de FISH, alterações citogenéticas relacionadas ao cromossomo 9p (amplificações), utilizando a sonda JAK2 (9p24) *Break (Kreatech Diagnostics®)* nos cortes do TMA e inteiros dos blocos parafinados

existentes. A escolha desta sonda monogênica para o estudo, baseou-se na justificativa de ser a única comercialmente disponível na época da aquisição dos insumos, que se prestava à marcação do braço curto do cromossomo 9p, conforme especificações na bula do fabricante.

O protocolo técnico utilizado foi o que se segue:

A – Primeiro dia:

- 1- Desparafinização em Xilol (3 banhos de 10 minutos cada);
- 2- Passagens em álcool (3 banhos de 5 minutos cada);
- 3- Passagem em água destilada (3 banhos de 2 minutos cada);
- 4- Banho em solução 0.2N de HCl por 20 minutos à temperatura ambiente;
- 5- Pré-tratamento em Citrato pH 6,0 (80° C em banho-maria por 1 hora);
- 6- Digestão enzimática com pepsina (pronta pra uso) por 8 minutos à temperatura ambiente;
- 7- Lavagem em solução de 2 X SSC por 2 minutos à temperatura ambiente;
- 8- Desidratação em álcool 75%, 80% 100% por 2 minutos cada;
- 9- Secagem das lâminas ao ar;
- 10- Aplicação da sonda: 10µl e incubação no Hibridizador para desnaturação e hibridização (desnaturação: 90° C por 10 minutos; Hibridização: 37° C por 24 horas).

B – Segundo dia:

- 11- Pré-aquecer solução de 1,5M UREA/0,1 x SSC em banho-maria à 45°C;
- 12- Mergulhar as lâminas em solução de UREA/ 0,1 x SSC à 45°C por 30 minutos;

- 13- Lavar em solução 2xSSC por 2 minutos à temperatura ambiente;
- 14- Desidratação em álcool 75%, 80% e 100% por 2 minutos cada;
- 15- Secagem das lâminas ao ar;
- 16- Aplicar 15µl DAPI e montar com lamínula.

As análises das lâminas foram realizadas em um microscópio de fluorescência, marca *Olympus*® modelo BX41, pertencente ao Departamento de Anatomia Patológica do ACCCC, por uma patologista (IW) experiente na avaliação desta técnica. Foram considerados ganhos quando havia 3 ou mais cópias do gene (sinais) em pelo menos 20% das células avaliadas. Em contrapartida, havia normalidade quando encontradas duas cópias (sinais) do gene. Os resultados, também, foram tabulados na ficha de coleta de dados e na planilha do Excel, para submissão aos testes estatísticos. Os casos em que não houve sinais de ampliação ou normalidade foram anotados como “não funcionou”.

4.10 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os dados relativos às reatividades para os marcadores IHQ empregados e os resultados do FISH foram tabelados juntamente com os demais dados clínicos em uma planilha do Excel (*Windows*). Realizaram-se análises estatísticas de associação, aplicando o teste exato de Fisher, entre os parâmetros clínicos, destes, com os marcadores IHQ e FISH, dos marcadores IHQ entre si e com o FISH. Foram consideradas estatisticamente relevantes as correlações com $p < 0,05$. Para análise multivariada foi utilizado o modelo de regressão de COX, em que todos os

parâmetros com $p < 0,2$ nas análises univariadas foram incluídos no modelo. Um patologista experimentado em estatística (AHJFMC) auxiliou na execução dos testes, bem como na interpretação dos achados.

5 RESULTADOS

5.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E EVOLUTIVAS

No período de 1975 a 2011 foram levantados, nas cinco instituições, um total de 88 casos diagnosticados como linfoma de grandes células com imunofenótipo B e topografia mediastinal, os quais preencheram os critérios histopatológicos, clínicos e IHQ para o diagnóstico de LBPM. Deste total, foram excluídos 02 casos com infiltração da medula óssea ao diagnóstico; e 23 casos por não possuírem amostras biológicas suficientes para as análises. Portanto, foram incluídos no estudo 63 casos com amostras biológicas fixadas em formol e embebidas em parafina, disponíveis nos arquivos dos departamentos de Anatomia Patológica das instituições. Destes 63 29 não possuíam material suficiente para confecção do TMA. Nestes foram realizados cortes histológicos inteiros e submetidos às mesmas reações IHQ do grupo incluído em TMA. A distribuição dos casos por instituição e gênero está especificada na Figura 8. Houve uma discreta prevalência do sexo feminino, correspondendo a 50,8% dos casos, e o ACCCC foi a instituição que mais forneceu casos ao estudo 22 casos (34,9%), seguida da UNICAMP com 18 casos (28,5%).

Em 61 dos 63 casos foi possível a obtenção de informações sobre o seguimento / desfecho clínico. Destes, o tempo de seguimento variou de 1 a 137 meses, com mediana de 33 meses e média de 40,3 meses. A idade dos pacientes variou de 16 a 83 anos, com mediana de 30 anos e média de 38,9 anos. A maioria dos casos foi referida como da raça branca (90,5%). Quanto aos dados clínicos, em

79,4% dos casos a neoplasia foi diagnosticada como massa mediastinal (*bulky*), estando restrita ao mediastino em 68,3% dos casos. Os pacientes não apresentavam sintomas B em 57,1% dos casos e apresentavam LDH elevado ao diagnóstico em 63,5% das vezes, sendo que em 15 casos (23,8%) não foi possível obter este dado. O IPI ajustado para a idade foi obtido em 59 casos. Destes, 54,2% eram de baixo risco; 5% de risco intermediário baixo; 27,1% intermediário alto; e 13,5% de alto risco. Ao diagnóstico, o estágio clínico da maioria dos pacientes era Ann Arbor I ou II (57,1%). Dezenove casos (30,2%) possuíam estágio IV ao diagnóstico, sendo que, destes, além da massa mediastinal, 6/19 (31,6%) possuíam comprometimento pulmonar; 2/19 (10,5%) lesão cardíaca / pericárdica; 1/19 (5,2%) lesão hepática; 1/19 (5,2%) lesão renal; e 1/19 (5,2%) lesão no sistema nervoso central. Em 8/19 (42,1%) não foi possível obter a topografia. Estes casos foram computados como estágio IV por haver esta informação nos prontuários médicos examinados. O resumo dos dados clínicos, obtidos para os 63 pacientes, está especificado na Tabela 1.

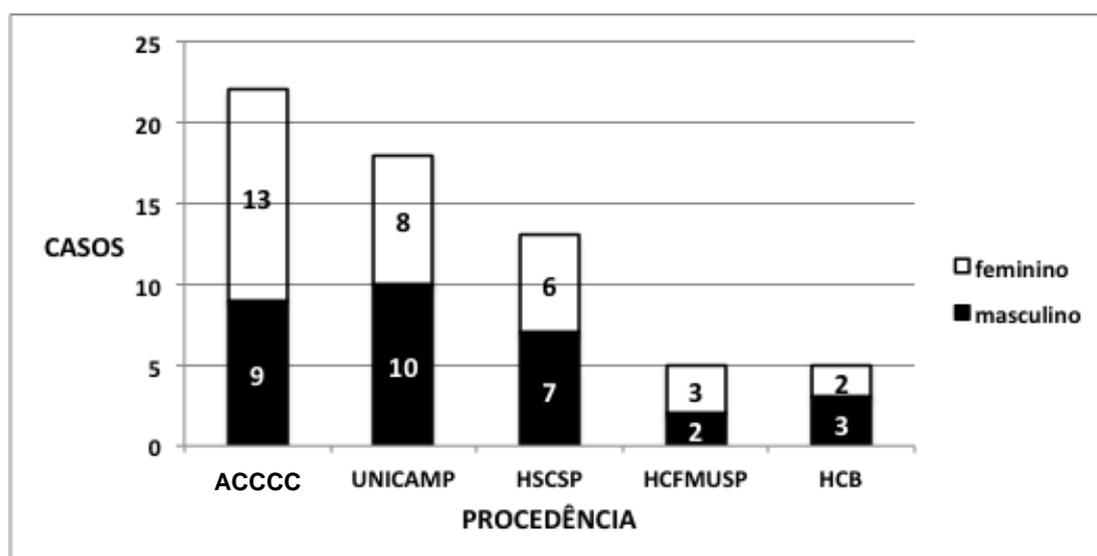


Figura 8 - Distribuição por gênero e procedência dos 63 casos de LBPM selecionados.

Tabela 1 - Dados clínicos e epidemiológicos referentes aos 63 pacientes incluídos no estudo.

VARIÁVEL	CATEGORIA	N	%
	N	63	
Idade (anos)	Varição	16 a 83	
	Mediana	30	
	Média	38,9	
Sexo	Feminino	32	50,8
	Masculino	31	49,2
Raça	Branca	57	90,5
	Negra	5	7,9
	Amarela	1	1,6
Sintomas B	Sim	25	39,7
	Não	36	57,1
	DNI	2	3,2
“Bulky”	Presente	50	79,4
	Ausente	12	19
	DNI	1	1,6
Restrito ao mediastino	Sim	43	68,3
	Não	20	31,7
Desidrogenase láctica	Normal	8	12,7
	Elevado	40	63,5
	DNI	15	23,8
Estádio clínico	I	10	15,8
	II	26	41,3
	III	6	9,5
	IV	19	30,2
	DNI	2	3,2
IPI	Baixo Risco	32	50,8
	Risco Interm Baixo	3	4,8
	Risco Interm Alto	16	25,4
	Alto Risco	8	12,7
	DNI	4	6,3

DNI: Dado não informado ou não obtido.

Quanto ao tratamento, 57 (90,5%) dos 63 casos foram submetidos a algum esquema de QT. Destes 21 casos (36,8%) receberam inicialmente o esquema CHOP; 24 casos (42,1%) receberam inicialmente o R-CHOP; e 12 casos (21%) receberam inicialmente outros esquemas variados de acordo com cada serviço, sendo em 4 casos o VACOP-B; 1 caso o ProMACE-CytaBOM; 1 caso o CEOP (*cyclophosphamide, epirubicin, vincristine [Oncovin], and prednisone*) e em 6 casos não foi possível obter o tipo de QT. A quantidade de ciclos variou de 1 a 12 com uma mediana de 6 ciclos. A RT, quando empregada (47,6%), foi sempre associada aos esquemas de QT como terapia de consolidação ou nos casos com resposta parcial ao

primeiro esquema de QT proposto. Cinco casos dos 63 (7,9%) foram submetidos a transplante de medula óssea associado aos demais esquemas terapêuticos, e todos estes pacientes estavam vivos quando da última consulta ao prontuário. Quanto à resposta inicial ao tratamento instituído, foi possível obter dados em 58 casos (92%). Destes, 34 casos (58,6%) obtiveram remissão completa da doença após o término do tratamento, dos quais 5 (14,7%) recidivaram em tempos variáveis (4, 9 28, 48 e 99 meses após o término do primeiro ciclo instituído). Em dois casos (3,4%) a resposta foi parcial; e em 22 (37,9%) não houve resposta ao tratamento inicial e todos progrediram a óbito. Para os casos com resposta parcial, a conduta comumente instituída foi a ampliação do número de ciclos de QT ou troca por outro esquema e/ou associação a RT.

Dada a última consulta ao prontuário médico, foi possível obter informações sobre o tempo de seguimento e desfecho clínico em 61 (96,8%) dos 63 casos. Nestes o seguimento variou de 1 a 137 meses com média de 40,3 meses e mediana de 33 meses. Dos 61 pacientes, 26 (42,6%) morreram pela doença; 4 (6,5%) estavam vivos com a doença; e 31 (50,8%) estavam vivos sem a doença. Neste último grupo o seguimento clínico variou de 8 a 127 meses com mediana de 49,5 meses. Os dados obtidos relativos ao tratamento e à evolução para os 63 pacientes estão resumidos no Quadro 6.

Quadro 6 - Dados de tratamento e evolução clínica de pacientes com LBPM.

Caso	Hospital	Idade	Sexo	QT tipo	Núm de ciclos	RT	Seguimento (meses)	Resposta ao trat.	Recidiva	TX	Status
01	ACCCC	31	F	outra	7	sim	70	Completa	Sim	-	OB
02	ACCCC	83	F	CHOP	7	sim	53	Progressão	-	-	OB
03	ACCCC	54	M	CHOP	5	sim	6	Progressão	-	-	OB
04	ACCCC	21	F	CHOP	8	sim	137	Completa	Sim	Sim	VSD
05	ACCCC	21	F	CHOP	6	sim	70	Completa	Não	-	VSD
06	ACCCC	23	F	CHOP	6	não	10	Progressão	-	-	OB
07	ACCCC	58	F	R-CHOP	8	não	33	Completa	Sim	-	OB [#]
08	ACCCC	28	F	R-CHOP	7	sim	67	Completa	Não	-	VSD
09	ACCCC	28	F	R-CHOP	8	sim	100	Completa	Não	-	VSD
10	ACCCC	62	M	CHOP	6	sim	10	Progressão	-	-	OB
11	ACCCC	82	F	CHOP	6	não	110	Completa	Sim	-	OB
12	ACCCC	53	M	CHOP	8	sim	31	Progressão	-	-	OB
13	ACCCC	36	F	outra	6	sim	69	Completa	Não	-	VSD
14	ACCCC	26	F	CHOP	4	sim	123	Completa	Não	-	VSD
15	UNICAMP	44	M	outra	12	sim	78	Completa	Não	-	VSD
16	UNICAMP	32	M	outra	12	não	11	Progressão	-	-	OB
17	UNICAMP	26	M	outra	6	sim	18	Progressão	-	-	OB
18	UNICAMP	66	F	CHOP	1	não	1	Progressão	-	-	OB
19	UNICAMP	83	M	-	-	não	1	Progressiva	-	-	OB
20	UNICAMP	23	F	R-CHOP	6	sim	10	Parcial	-	-	VCD
21	UNICAMP	21	M	R-CHOP	6	não	73	Completa	Não	-	VSD
22	UNICAMP	33	M	R-CHOP	6	sim	66	Completa	Não	-	VSD
23	UNICAMP	26	M	R-CHOP	6	não	9	Progressão	-	-	OB
24	UNICAMP	25	F	outra	12	sim	15	Progressão	-	-	OB
25	UNICAMP	25	F	-	-	-	-	-	-	-	-
26	UNICAMP	30	F	R-CHOP	6	sim	69	Completa	Não	-	VSD
27	UNICAMP	27	M	R-CHOP	10	sim	65	Completa	Não	-	VSD
28	UNICAMP	44	M	R-CHOP	9	sim	45	Completa	Não	-	VSD
29	UNICAMP	29	F	outra	12	sim	90	Completa	Não	-	VSD
30	UNICAMP	81	M	-	-	não	1	Progressão	-	-	OB
31	UNICAMP	30	F	Outra	2	sim	2	Progressão	-	-	OB
32	HSCSP	26	M	CHOP	8	sim	101	Completa	Não	-	VSD
33	HSCSP	23	F	CHOP	8	não	8	Progressão	-	-	OB
34	HSCSP	78	F	outra	8	não	45	Completa	Sim	-	VSD
35	HSCSP	23	F	-	-	-	-	-	-	-	-
36	HSCSP	29	M	CHOP	1	não	1	-	-	-	VCD
37	HSCSP	27	M	R-CHOP	3	não	11	Parcial	-	Sim	VCD
38	HSCSP	20	M	CHOP	3	não	3	Progressão	-	-	OB
39	HCFMUSP	61	F	Outra	6	não	7	Progressão	-	-	OB
40	HCFMUSP	39	M	CHOP	3	sim	7	Progressão	-	-	OB
41	HCFMUSP	65	F	CHOP	6	sim	13	Completa	Não	-	VSD

Cont/ Quadro 6

Caso	Hospital	Idade	Sexo	QT tipo	Núm de ciclos	RT	Seguimento (meses)	Resposta ao trat.	Recidiva	TX	Status
42	HCFMUSP	72	M	CHOP	6	sim	47	Completa	Não	-	VSD
43	HCFMUSP	19	F	-	-	-	37	Completa	Não	-	VSD
44	HCBS	51	M	CHOP	2	não	2	Progressão	-	-	OB
45	HCBS	24	F	CHOP	4	não	9	Progressão	-	-	OB
46	HCBS	32	F	CHOP	8	sim	80	Completa	Não	-	VSD
47	HCBS	24	M	-	-	-	1	-	-	-	VCD
48	HCBS	32	M	outra	3	não	3	Progressão	-	-	OB
49	ACCCC	23	M	R-CHOP	5	sim	43	Completa	Não	-	VSD
50	ACCCC	35	M	R-CHOP	8	sim	50	Completa	Não	-	VSD
51	ACCCC	23	M	R-CHOP	4	sim	52	Completa	Não	-	VSD
52	ACCCC	16	M	R-CHOP	8	não	19	Completa	Não	-	VSD
53	ACCCC	74	M	R-CHOP	8	não	33	Completa	Não	-	VSD
54	ACCCC	39	F	R-CHOP	8	não	32	Completa	Não	-	VSD
55	ACCCC	42	M	R-CHOP	6	não	34	Completa	Não	-	VSD
56	ACCCC	30	M	R-CHOP	6	sim	55	Completa	Não	-	VSD
57	UNICAMP	82	F	outra	1	não	1	Progressão	-	-	OB
58	HSCSP	54	M	R-CHOP	6	não	8	Progressão	-	-	OB
59	HSCSP	34	M	CHOP	8	não	99	Completa	Não	Sim	VSD
60	HSCSP	27	M	R-CHOP	5	não	6	Progressão	-	-	OB
61	HSCSP	25	F	R-CHOP	8	não	73	Completa	Não	-	VSD
62	HSCSP	24	F	R-CHOP	6	não	63	Completa	Não	Sim	VSD
63	HSCSP	32	F	R-CHOP	8	não	55	Completa	Não	Sim	VSD

M= masculino; F= feminino; TX= transplante de medula óssea; VCD= vivo com doença; VSD= vivo sem doença; OB= óbito pela doença. # óbito por parada cardiorrespiratória durante indução anestésica.

Em relação aos tipos de tratamento empregados, pode-se observar na Tabela 2 que o grupo submetido ao tratamento com R-CHOP obteve melhor resposta terapêutica, com 75% dos pacientes apresentando remissão completa após o término do tratamento inicial instituído. Em contrapartida, pacientes submetidos ao esquema CHOP e a outros esquemas terapêuticos, obtiveram remissão completa em 38,1% e 33,3% dos casos, respectivamente.

Tabela 2 - Resposta ao tratamento por tipo de QT empregada em 57 pacientes com LBPM.

EVOLUÇÃO	TIPO DE QT		
	CHOP	R-CHOP	OUTROS
n	21	24	12
Remissão completa	8 (38,1%)	18 (75%)	4 (33,3%)
Progressão (óbito)	12 (57,1%)	4 (16,7%)	8 (66,7%)
Vivo com doença	1 (4,8%)	2 (8,3%)	-

5.2 VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS

Os achados histológicos foram variáveis, com a maioria dos casos constituídos por proliferação de grandes células linfoides, com núcleos variando de cetroblásticos a imunoblásticos, quase sempre formando ninhos celulares compartimentalizados por fibras colágenas delgadas (aspecto alveolar) (Figura 9). Poucos casos mostraram predomínio do componente fibroso em relação ao celular e, não infrequente, havia associação com áreas de necrose. Raros casos apresentavam células de tamanho médio e, outros, com celularidade mista variando de pequenos a médios linfócitos, em meio aos quais notavam-se algumas células gigantes, por vezes, multinucleadas, tipo *Hodgkin-like* (Figura 10).

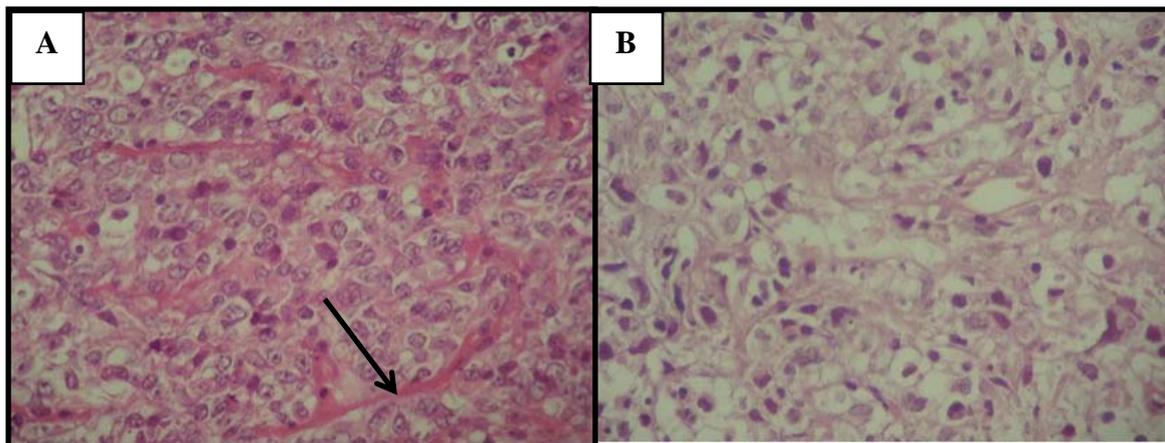


Figura 9 - Aspecto histológico predominante com células grandes centroblásticas ou imunoblásticas entremeadas por bandas delgadas de colágeno (A – seta) e aspecto alveolar (B) – 400X.

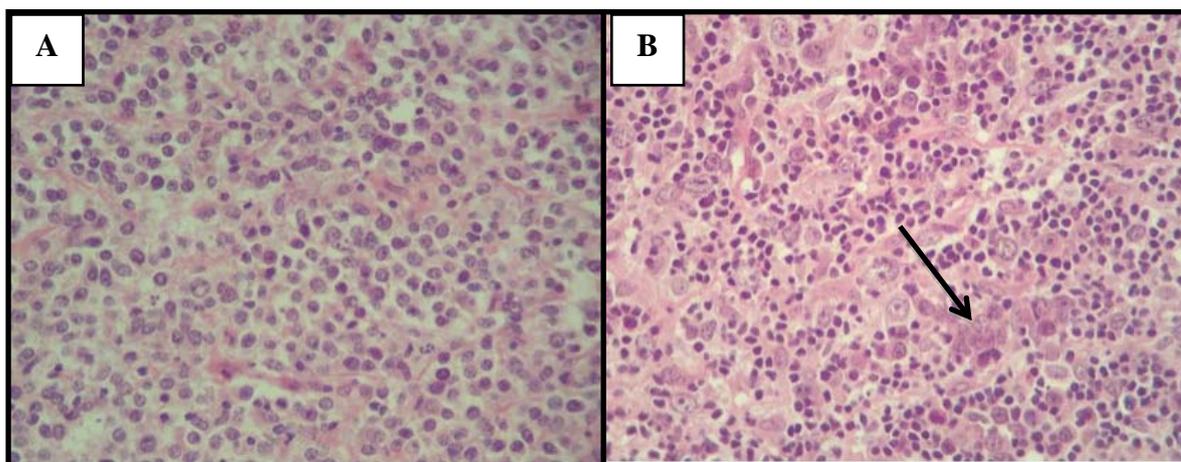


Figura 10 - Achados histológicos incomuns. A- Predomínio de células de tamanho médio; B- Celularidade mista com presença de células gigantes *Hodgkin-like* (seta) – 400X.

5.3 VARIÁVEIS IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Os resultados das reações IHQ foram tabulados na ficha de coleta de dados e na planilha do Excel para cada paciente, obedecendo aos critérios de avaliação especificado no Quadro 5. Dentre os marcadores IHQ relacionados à patogênese do LBPM, houve positividade elevada em todos os cinco marcadores estudados, com destaque para o JMJD2c e JAK2, expressos em mais de 90% dos casos (Tabela 3 e Figura 11).

Tabela 3 - Resultado dos marcadores IHQ relacionados a patogênese em 63 casos de LBPM.

RESULTADO casos / N (%)	MARCADOR				
	JMJD2c	SOCS1	STAT6	JAK2	PDL1
NEGATIVO	3/59 (5,1%)	22/63 (34,9%)	15/60 (25,0%)	6/62 (9,7%)	7/59 (11,9%)
POSITIVO	56/59 (94,9%)	41/63 (65,1%)	45/60 (75,0%)	56/62 (90,3%)	52/59 (88,1%)
NR	4	0	3	1	4

NR: não realizado.

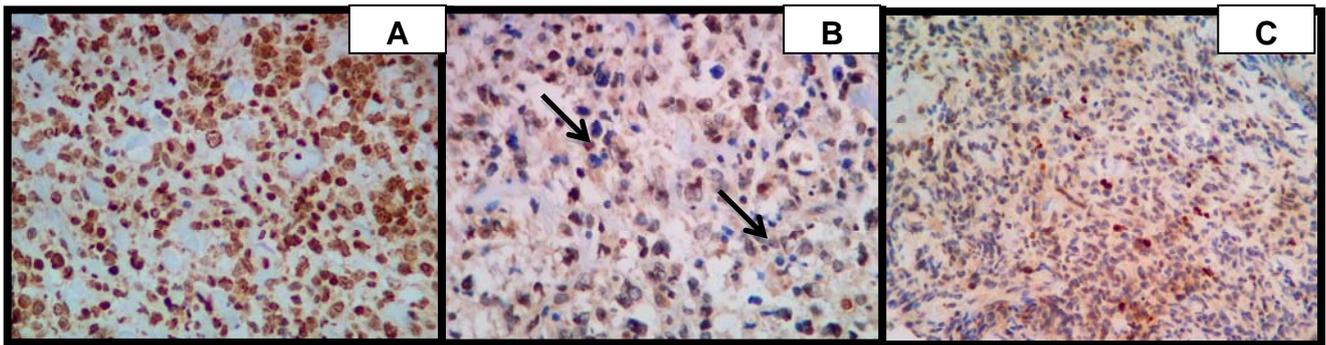


Figura 11 - Exemplos dos achados IHQ para os marcadores relacionados a patogênese do LBPM – JAK2. A: Caso positivo em TMA; B: Caso positivo em corte inteiro (pequenos linfócitos reacionais negativos – setas; C: Caso negativo em corte inteiro – 400X.

Já os marcadores relacionados ao ciclo celular, destacamos predomínio de casos positivos para topoisomerase IIa (84,1%), p15 (76,2%), p53 (76,2%) e p16 (61,9%) e de casos negativos para os anticorpos Ciclina E (88,7%), p63 (79,4%), Ciclina D1 (79,4%) e Ciclina D2 (61,9%). Para os demais anticorpos (p21, p27, Ciclina D3 e mdm2), não houve diferença considerável entre o total de casos positivos e negativos. Os dados obtidos referentes às reações IHQ dos marcadores relacionados ao ciclo e proliferação celular, com exceção do Ki-67, estão expostos na Tabela 4. A Figura 12 demonstra exemplos das reações IHQ com destaque para os marcadores que obtiveram os maiores índices de positividade e negatividade.

Tabela 4 - Resultado dos marcadores IHQ relacionados ao ciclo celular em 63 casos de LBPM.

RESULTADO casos / N (%)	MARCADOR											
	p15	p16	p21	p27	p53	p63	Ciclina D1	Ciclina D2	Ciclina D3	Ciclina E	mdm2	topIIa
NEGATIVO	15/63 (23,8%)	24/63 (38,1%)	37/63 (54%)	37/63 (54%)	15/63 (23,8%)	50/63 (79,4%)	50/63 (79,4%)	39/63 (61,9)	36/63 (57,1%)	55/62 (88,7%)	36/62 (58,1%)	10/63 (15,9%)
POSITIVO	48/63 (76,2%)	39/63 (61,9%)	26/63 (41,3%)	26/63 (41,3%)	48/63 (76,2%)	13/63 (20,6%)	13/63 (20,6%)	24/63 (38,1%)	27/63 (42,9%)	7/62 (11,3%)	26/62 (41,9%)	53/63 (84,1%)
NR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0

NR: não realizado; topIIa: topoisomerase IIa.

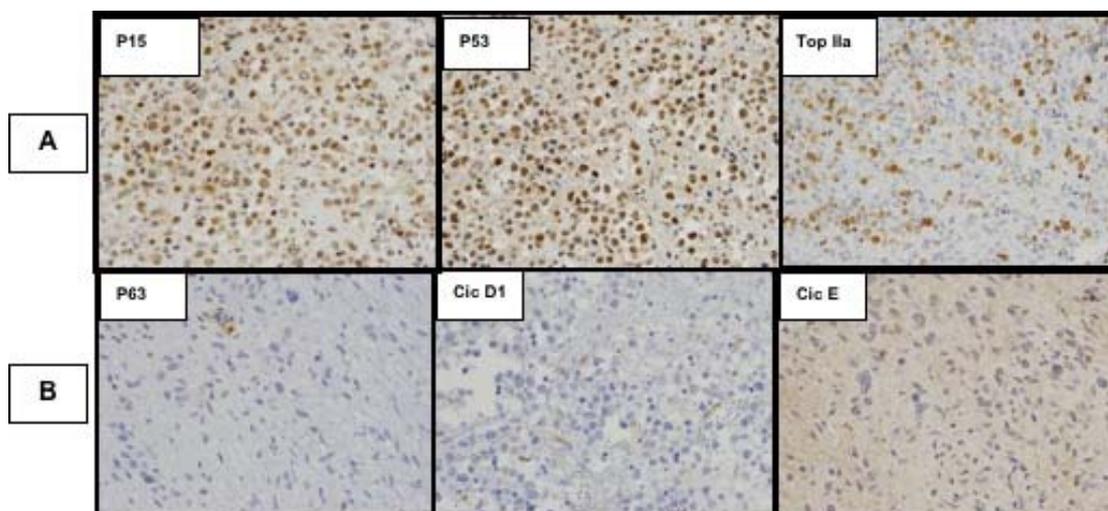
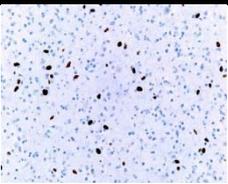
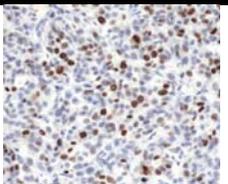
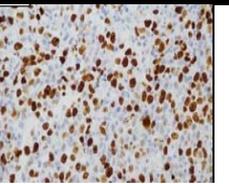


Figura 12 - Exemplos das reações IHQ relacionadas ao ciclo celular, com destaque aos marcadores com maiores índices de positividade (A) e negatividade (B) nos 63 casos de LBPM avaliados. (400X).

Quanto aos marcadores de proliferação celular, havia-se incluído, inicialmente, o Ki-67 e Survivina. Contudo, durante avaliação do segundo, teve-se dificuldades na padronização e interpretação das reações, uma vez que se observava intensa “reação de fundo” e imunomarcagem nuclear débil. Optou-se, então, por descartar a Survivina e incluir apenas o Ki-67. A maioria dos 63 casos, 37 (58,7%),

possuía índice proliferativo alto, ou seja, imunomarcção em mais de 50% das células neoplásicas. Em 20 casos (31,7%), o índice proliferativo foi moderado, e, em apenas 6 casos (9,5%), avaliado como baixo (menos de 10% das células neoplásicas positivas). Consolidando estes dados, tem-se que 90,5% dos casos apresentaram um elevado índice proliferativo (imunomarcção moderada a alta). A Tabela 5 demonstra os dados obtidos na avaliação do Ki-67.

Tabela 5 - Dados relativos a avaliação do Ki-67 nos 63 casos de LBPM.

GRUPOS	KI-67		
	Baixo (<10%)	Moderado (11-50%)	Alto (>50%)
CASOS / n (%)	6/63 (9,5%)	20/63 (31,7%)	37/63 (58,7%)
EXEMPLOS (400X)			

5.4 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO 9p POR FISH

Foram obtidos sinais fluorescentes em 39 (61,9%) dos 63 casos. Para os demais casos (24 / 38,1%) as reações “não funcionaram”. Em 27 (69,2%) dos 39 casos, os sinais obtidos foram de normalidade (duas cópias = dois sinais) e, em 12 casos (30,8%), foram de ampliações. Neste último grupo, 7 casos (58,4%) possuíam 3 cópias; 3 casos (25%) possuíam 4 cópias; 1 caso (8,3%) possuía 5 cópias; e em 1 caso (8,3%) a amplificação encontrada foi em “clusters”. Os resultados das reações de FISH para cada caso estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados do FISH (9p) em 63 casos de LBPM.

INTERPRETAÇÃO	FISH 9p		
	Normais	“Ganhos / Amplificados”	“Não funcionaram”
CASOS	27 / 39 (69,2%)	12 / 39 (30,8%)	24

5.5 CORRELAÇÕES E ASSOCIAÇÕES ESTATÍSTICAS

Quando confrontados os fatores clínicos com os achados de IHQ, observou-se que os dados clínicos com mais associações significativas foram o estágio clínico e o IPI. Ambos se correlacionaram a 7 (sete) marcadores de IHQ (Quadro 7). Entre os marcadores IHQ, foram obtidas várias associações significativas. No contexto destas, observou-se que houve ampla associação entre os marcadores relacionados à patogênese do LBPM, com exceção do PDL1 vs JMJD2c. Já para o grupo dos marcadores relacionados ao ciclo e proliferação celular, as associações foram variáveis com destaque para o p21 e a ciclina D3 como os marcadores que mais se associaram. Quando confrontados os dois grupos, chama atenção a correlação da Topoisomerase IIa e do Ki-67 com todos os marcadores IHQ da patogênese, a exceção do JMJD2c. Neste contexto, destacam-se também a correlação do p16 com o JAK2 e PDL1 (Quadro 8). Os resultados do FISH não estiveram associadas a nenhum dos parâmetros clínicos, tampouco aos marcadores IHQ da patogênese ou do ciclo e proliferação celular.

Nas análises univariadas para sobrevida global, os parâmetros clínicos que obtiveram P significativos foram: estágio clínico agrupado (I-II e III-IV - $p=0,0015$), se a doença era restrita ou não ao mediastino ($p=0,0003$), raça ($p=0,0058$) e IPI

($p < 0,0001$). Para os marcadores IHQ relacionados à patogênese, foram significantes o JAK2 ($p = 0,0009$) e o PDL1 ($p = 0,0007$). Já para os marcadores IHQ relacionados ao ciclo e proliferação celular, o único que se correlacionou à sobrevida global foi o p16 ($p = 0,0058$). Da mesma forma que nos testes de associação, o FISH também não se correlacionou à sobrevida global ($p = 0,62$). As curvas de sobrevidas para estes parâmetros estão nas Figuras 13-20.

Agregando os pacientes com base na presença ou ausência dos parâmetros clínicos e IHQ que se correlacionaram a melhor sobrevida (IPI baixo; estágio clínico precoce; JAK2 positivo, PDL1 positivo e p16 positivo) e utilizando um ponto de corte menor ou igual a 4 fatores presentes dentre os 5 possíveis, sugerimos um modelo preditor que divide os pacientes em dois grupos distintos de sobrevida, no qual cerca de 80% dos pacientes com todos os 5 fatores presentes estavam vivos ao término de 5 anos em comparação a cerca de 30% dos pacientes com 4 ou menos fatores presentes ($p = 0,0003$) (Figura 21). Contudo esta divisão não se correlacionou a prognóstico em análise multivariada.

Quanto ao tipo de tratamento inicialmente instituído, dividiu-se os pacientes em dois grupos, os que receberam R-CHOP e os que receberam CHOP ou esquemas CHOP-SÍMILE (04 casos com VACOP-B e 01 caso com ProMACE-CytaBOM). Deste modo a distribuição dos grupos foi de 21 pacientes tratados com R-CHOP vs 29 pacientes tratados com CHOP / CHOP-SÍMILE. Pacientes tratados com esquema R-CHOP tiveram maior sobrevida global em relação aos tratados com CHOP / CHOP-SÍMILE ($p = 0,121$), onde cerca de 82,5% dos pacientes tratados com R-CHOP estavam vivos ao término de 5 anos quando comparados a cerca de 48% dos pacientes tratados com CHOP/CHOP-SÍMILE (Figura 22).

Na análise multivariada através do modelo de regressão de COX, em que todos os parâmetros com $p < 0,2$ nas análises univariadas foram incluídos no modelo, quatro parâmetros mostraram ter associação independente com sobrevida (estádio clínico agrupado, raça, IPI e o p16) - $p < 0,0001$. Para estes parâmetros, temos as seguintes interpretações:

(I) Para o estágio clínico agrupado, pacientes com estágio I-II têm aproximadamente 95% menos chance de óbito que os pacientes de estágio III-IV, ou seja, este último grupo tem aproximadamente 20 vezes mais risco de óbito que os primeiros;

(II) Para o IPI isolado, o aumento de 1 grau aumenta o risco de óbito por um fator de 6,9. Para um aumento de 2 graus, o risco aumentará por um fator de 6,922, ou seja, 47,61 vezes;

(III) Indivíduos da raça negra têm 9,64 vezes mais risco de óbito que os pacientes da raça branca (ver Tabela 7);

(IV) Pacientes com p16 positivo têm aproximadamente 82,41% menos chance de óbito que os pacientes que tem p16 negativo, ou seja, este último grupo tem 5,6 vezes mais risco de óbito que pacientes com tumores p16 positivos.

Tabela 7 – Características clínicas, evolutivas e resultado do p16 nos pacientes de raça negra (n= 5 casos).

Caso	Procedência	Idade	EC	IPI	QT TIPO	Seguimento (meses)	Resultado do p16	Desfecho
18	UNICAMP	66	IVB	4	CHOP	1	-	OB
30	HSCSP	81	IVA	4	?	1	+	OB
32	HSCSP	26	IIB	1	CHOP	101	+	VSD
48	HCB	32	IIA	1	?	3	+	OB
58	HSCSP	54	IVB	3	R-CHOP	8	+	OB

EC: estágio clínico; OB: óbito pela doença; VSD: vivo sem doença; ?: Dado não obtido.

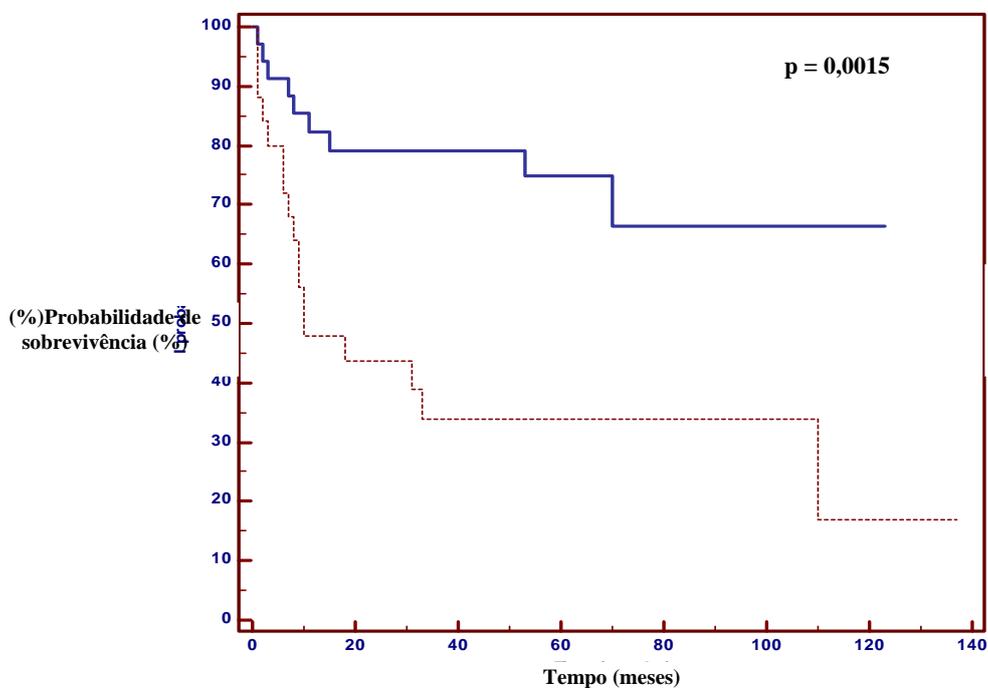


Figura 13 - Sobrevida global relacionada ao estágio clínico agrupado (n = 61/63).

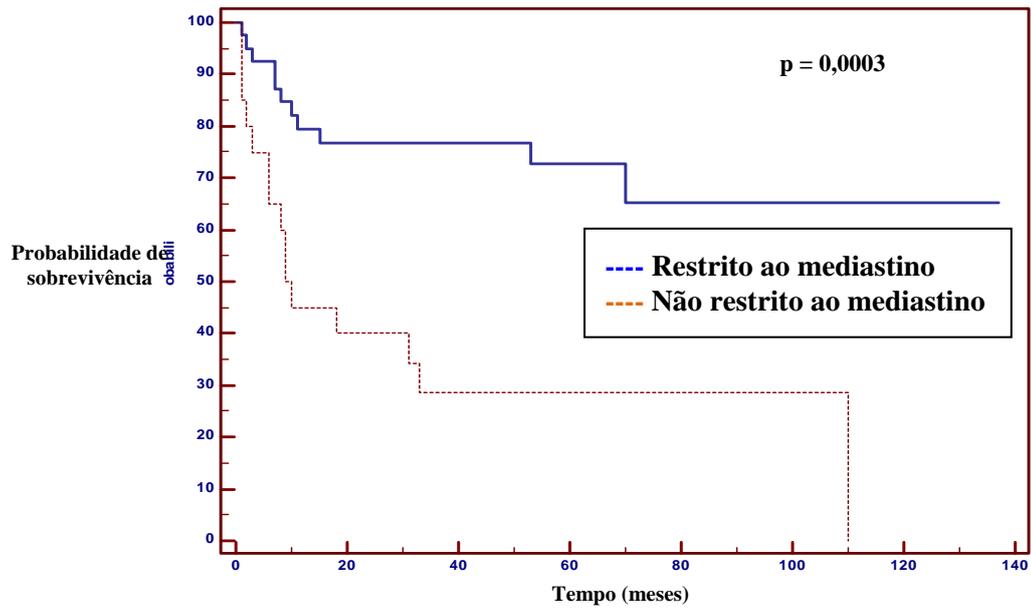


Figura 14 - Sobrevida global relacionada ao sítio da lesão (n = 61/63).

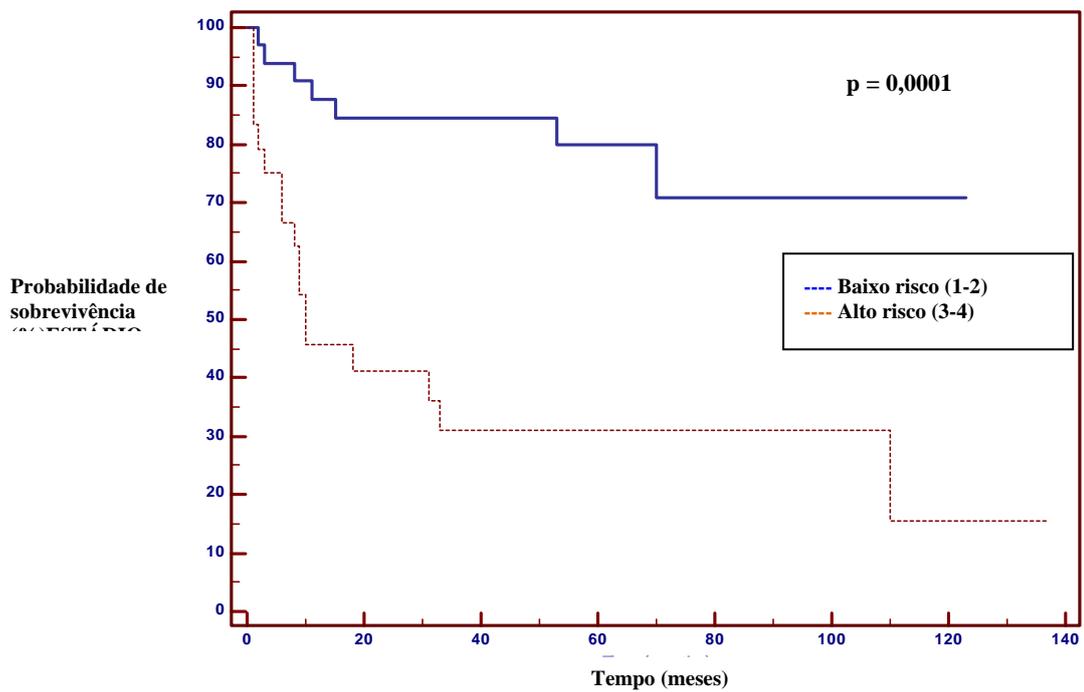


Figura 15 - Sobrevida global relacionada ao IPI agrupado (n = 59/63).

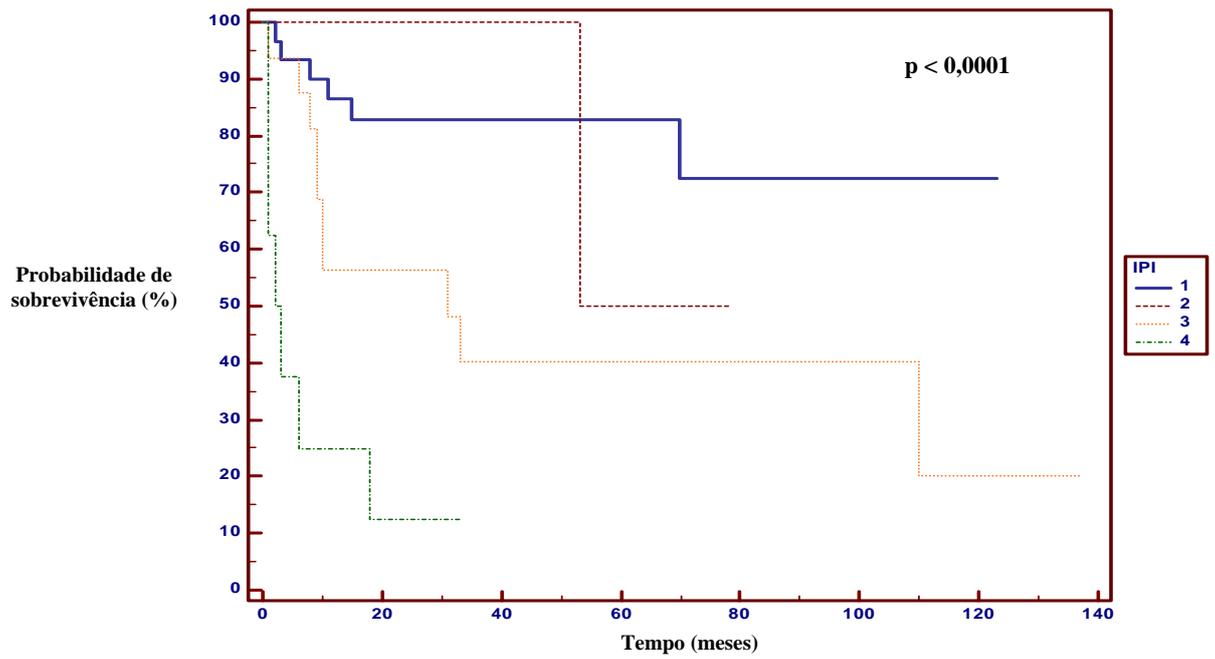


Figura 16 - Sobrevida global relacionada ao IPI isolado (n = 59/63).

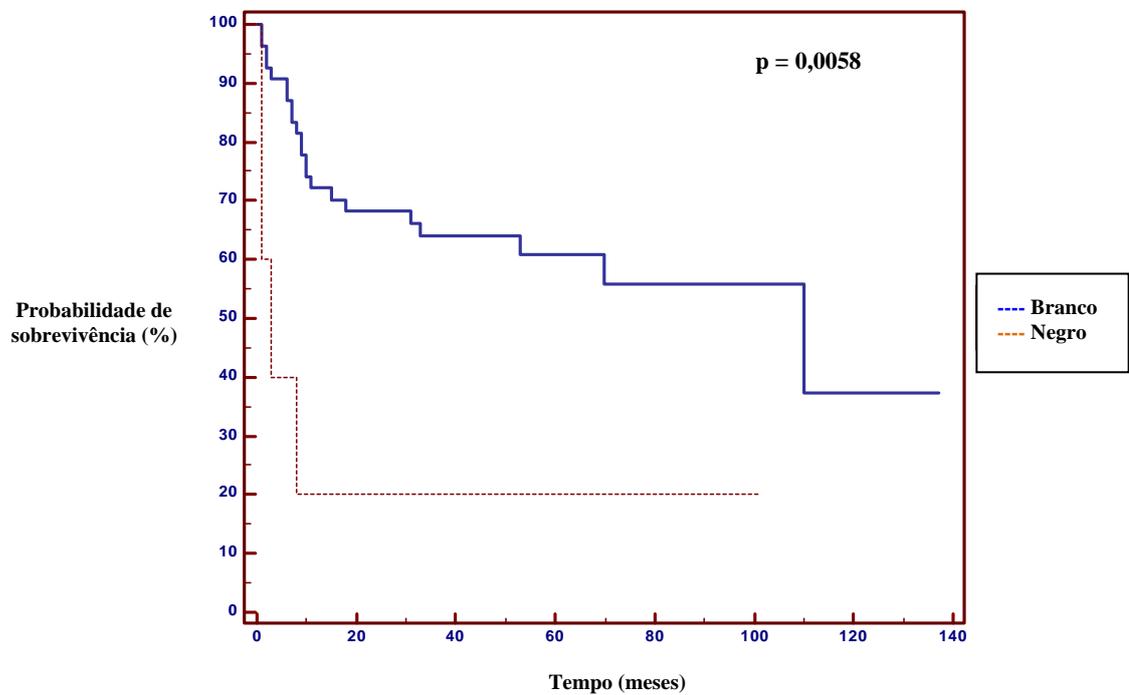


Figura 17 - Sobrevida global relacionada à raça (n = 60/63).

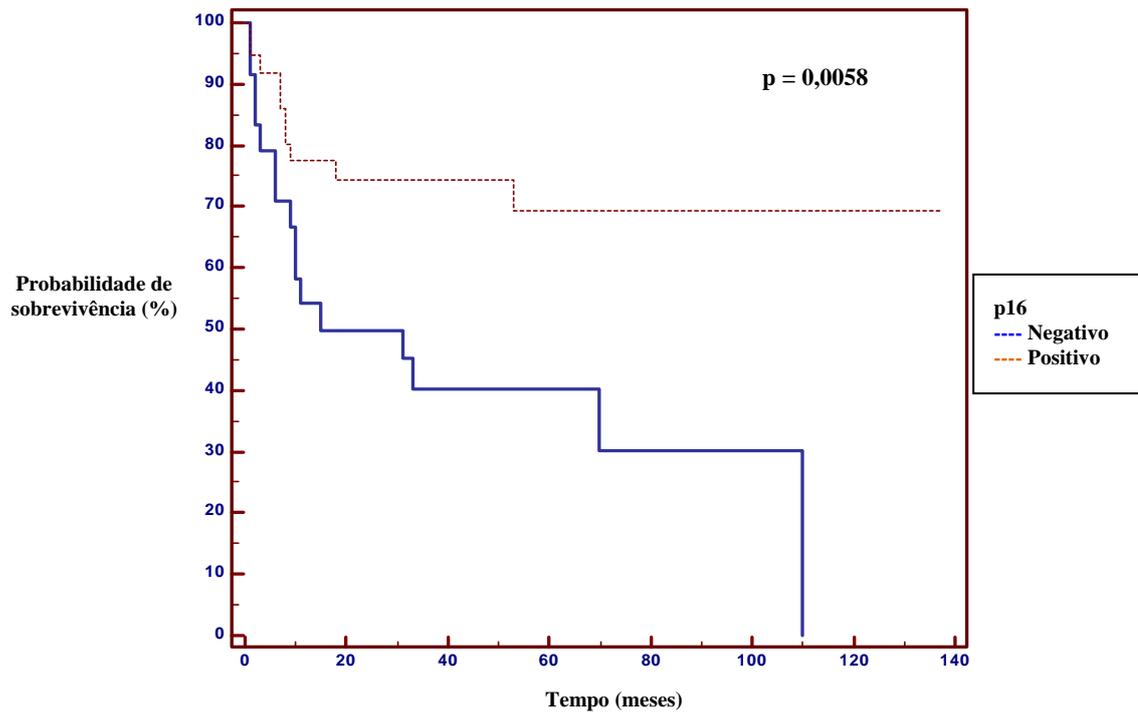


Figura 18 - Sobrevida global relacionada ao resultado do p16 (n = 61/63).

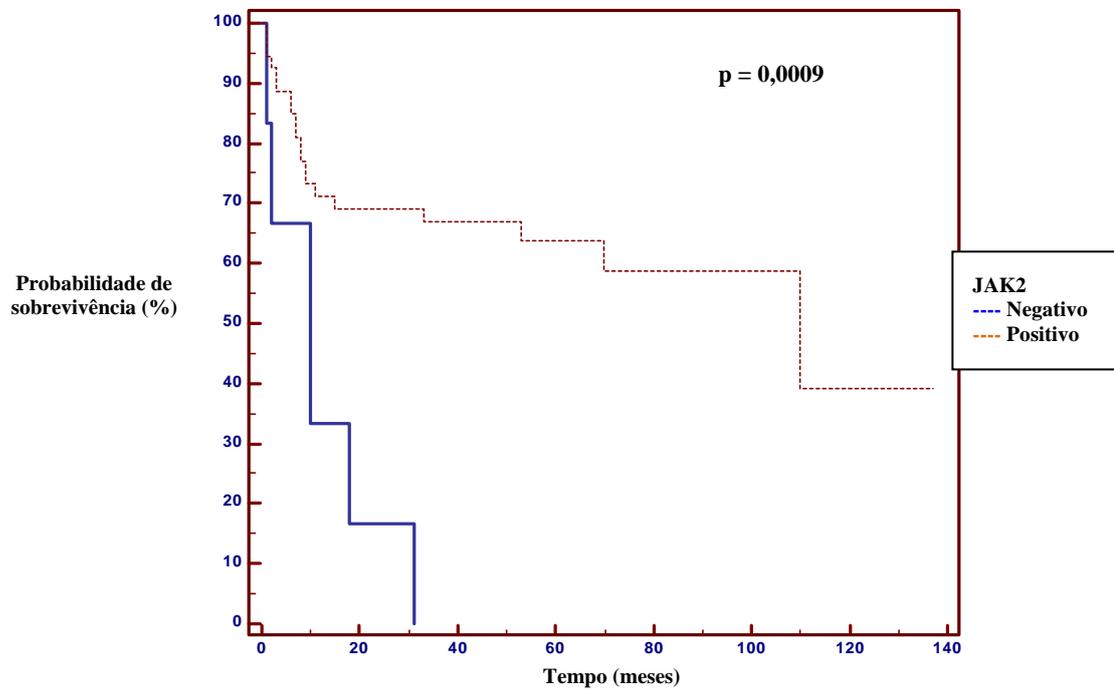


Figura 19 - Sobrevida global relacionada ao resultado do JAK2 (n = 60/63).

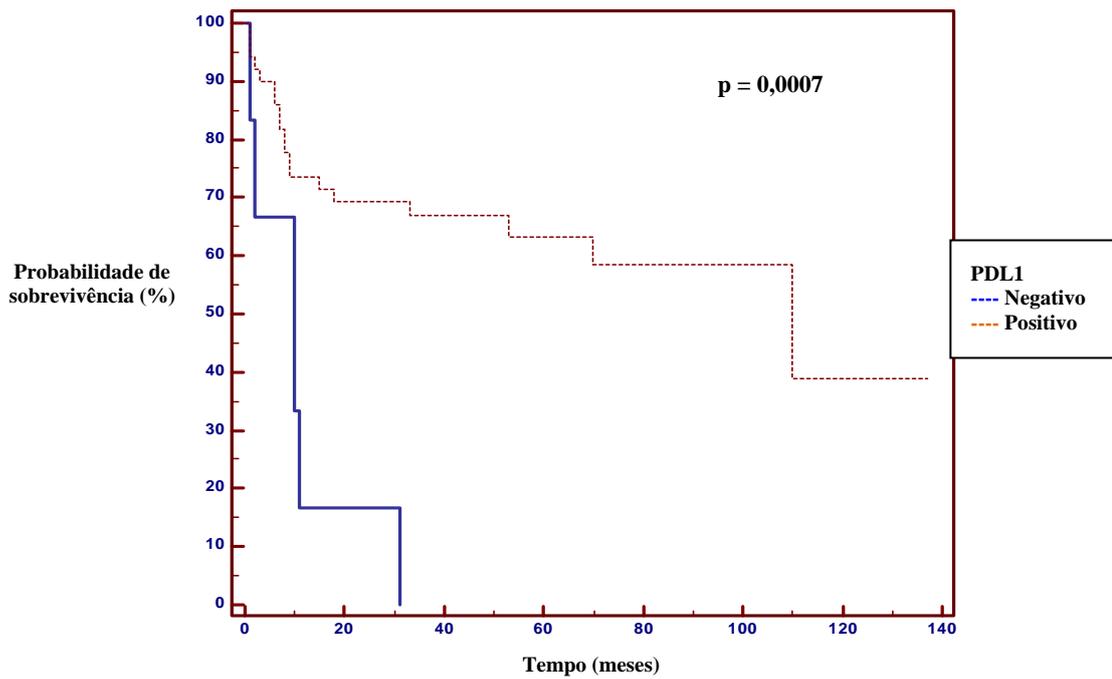


Figura 20 - Sobrevida global relacionada ao resultado do PDL1 (n = 57/63).

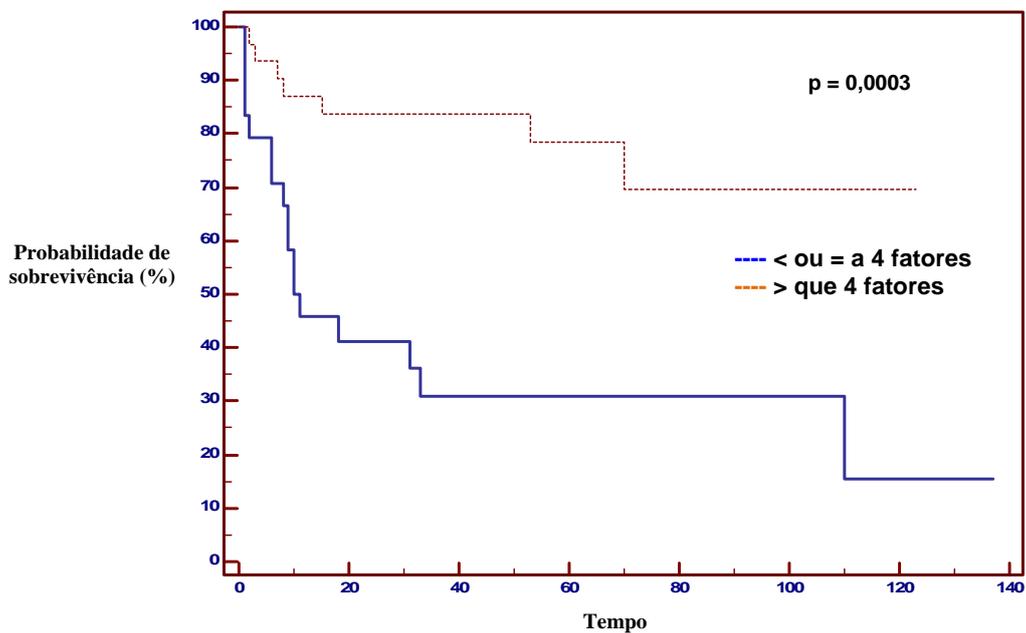


Figura 21 - Sobrevida global relacionada a presença ou ausência dos fatores com p significantes associados a sobrevida (IPI baixo; estágio clínico inicial; JAK2 positivo, PDL1 positivo e p16 positivo) (n = 57/63).

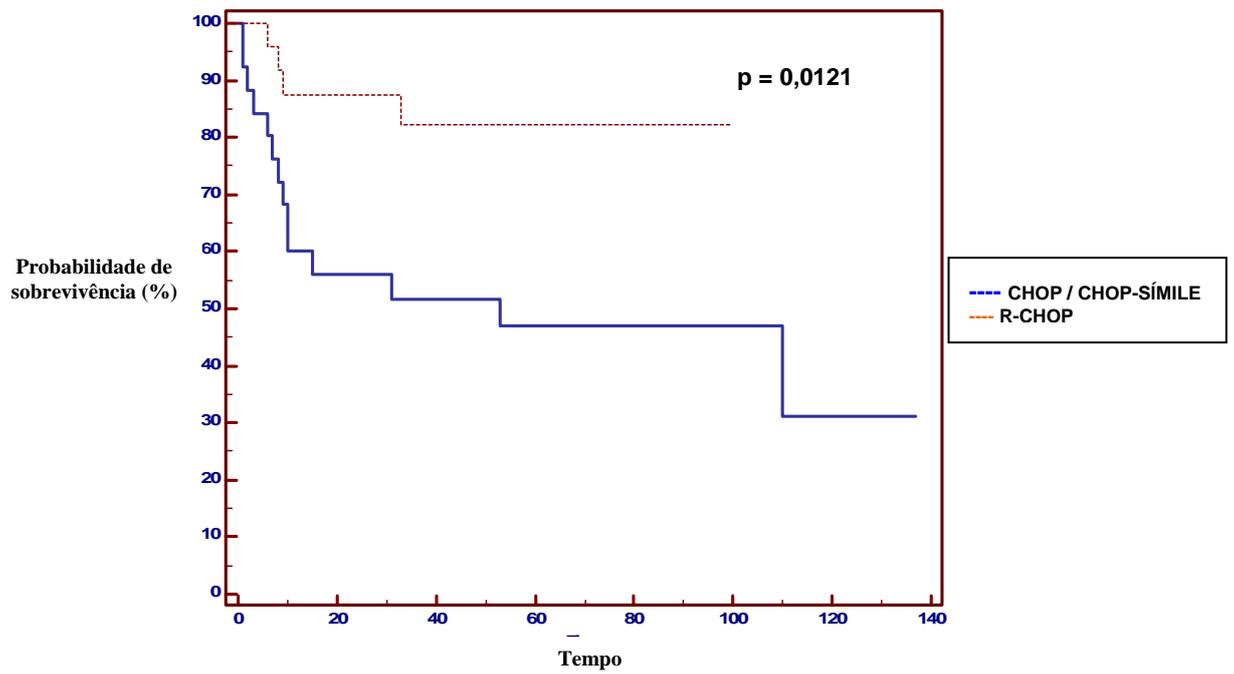


Figura 22 - Sobrevida global relacionada ao tipo de QT utilizada (n = 50/63).

Quadro 7 - Associação dos parâmetros clínicos com marcadores IHQ e FISH 9p.

	PROTEÍNAS E FISH9p																			
	P15	P16	P21	P27	P53	P63	Cd1	Cd2	Cd3	CE	Mdm2	Ki67	Top2	JMJD	SOCS	STAT6	JAK2	PDL1	FISH9p	
“Bulky”	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,7)
EC_AGR	NS	NS	0,007	0,007	NS	NS	NS	NS	0,003	NS	NS	0,03	0,01	NS	NS	0,03	0,003	NS	NS	NS (p=0,4)
GÊNERO	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,5)
HB	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,6)
IDADE	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,7)
IPI_AGR	NS	NS	NS	0,02	NS	NS	NS	NS	0,007	NS	NS	NS	0,02	NS	0,04	0,03	0,003	0,03	NS	NS (p=0,6)
LDH	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=1,0)
RAÇA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,1)
SINT B	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,4)
SÍTIO	NS	NS	0,02	0,02	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,02	NS	NS	0,01	NS	NS	NS (p=0,6)

NS: p não significante (p>0,05).

EC_AGR: estágio clínico agrupado (I-II e III-IV); HB: hemoglobina; IPI_AGR: IPI agrupado (I-II e III-IV); SINT B: sintomas B; Sítio: restrito ao mediastino ou não.

Cd1: ciclina D1; Cd2: ciclina D2; Cd3: ciclina D3; CE: ciclina E; Top2: Topoisomerase IIa.

Quadro 8 - Associação dos marcadores IHQ estudados entre si e com o FISH9p.

	P15	P16	P21	P27	P53	P63	Cd1	Cd2	Cd3	CE	MDM2	KI67	TOP2	JMJD	SOCS	STAT6	JAK2	PDL1	FISH9p
P15		NS	#0,01	NS	NS	NS	NS	NS	#0,01	NS	#0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,64)
P16			NS	NS	NS	#0,01	NS	NS	NS	#0,03	NS	*0,009	#0,03	NS	NS	NS	*0,02	*0,006	NS (p=0,71)
P21				*0,001	*0,01	*0,02	*0,00003	NS	*0,00007	NS	*0,01	NS	#0,003	NS	NS	NS	NS	#0,03	NS (p=0,17)
P27					*0,0001	NS	NS	NS	*0,004	NS	*0,0002	NS	NS	NS	NS	NS	NS	#0,03	NS (p=0,73)
P53						NS	NS	NS	NS	NS	#0,0001	NS	NS	NS	NS	NS	*0,02	NS	NS (p=0,44)
P63							NS	NS	NS	*0,03	NS	*0,009	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,13)
Cd1								NS	#0,01	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,69)
Cd2									NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	#0,03	NS (p=0,08)
Cd3										NS	NS	*0,01	#0,03	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,49)
CE											NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=0,17)
MDM2												NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS (p=1,0)
KI67													#0,00004	NS	#0,002	#0,0004	#0,002	#0,001	NS (p=1,0)
TOP2														NS	#0,02	#0,0004	*0,004	*0,0004	NS (p=1,0)
JMJD															#0,02	#0,01	#0,02	NS	NS (p=1,0)
SOCS																*0,003	*0,0008	*0,002	NS (p=1,0)
STAT6																	*0,0005	*0,002	NS (p=0,66)
JAK2																		*0,00002	NS (p=1,0)
PDL1																			NS (p=1,0)

Cd1: ciclina D1; Cd2: ciclina D2; Cd3: ciclina D3; CE: ciclina E; Top2: Topoisomerase IIa; NS: p não significante (p>0,05); #= Correlações diretas; *= Correlações inversas.

6 DISCUSSÃO

O p16 é uma proteína supressora tumoral, cuja principal função é regular o ciclo celular controlando a progressão G1-S (bloqueia o complexo ciclina-CDK). Há inúmeros trabalhos correlacionando mutações ou fenômenos epigenéticos ao bloqueio da função supressora desta proteína. Estas alterações têm sido consideradas como uma das possíveis vias de patogênese em algumas neoplasias, como carcinomas pancreático, gástrico, esofágico, pulmonar e prostático (ROCCO e SIDRANSKY 2001; REINHARDT e SCHUMACHER 2012). Como um biomarcador, têm sido associado ao prognóstico em pacientes com carcinoma de células escamosas da orofaringe associado à infecção pelo papiloma vírus humano (BARBER et al. 2013). Estudos originais demonstram alterações moleculares (deleção, inativação e metilação) associadas ao p16 em cerca de 10% dos casos de LBPM (SCARPA et al. 1999; SCARPA et al. 2001). Em nossa casuística, 61,9% (n=39/63) dos casos expressaram este marcador pela IHQ. De maneira interessante, dentre todos os marcadores IHQ de ambos os grupos estudados, o p16 foi o único com valor prognóstico independente, e de forma que pacientes cujos tumores expressam p16 possuem, aproximadamente, 82,41%, menor chance de óbito quando comparados aos p16-negativos ($p < 0,0001$). Ele correlacionou-se estatisticamente ao JAK2 e PDL1. Esta associação possivelmente explica-se tanto por uma questão topográfica, uma vez que o gene CDKN2A está localizado também na região 9p, como por uma questão funcional, já que p16 é um supressor tumoral e estaria contrapondo as atividades protooncogênicas do JAK2 e PDL1. Levando em

consideração estes achados e a baixa probabilidade das alterações gênicas pontuais descritas para o p16 estarem envolvidas na patogênese do LBPM, ganhos no 9p gerariam consequências dicotômicas no LBPM, de um lado, ativação da proliferação e diferenciação celular através da via JAK-STAT e, do outro, aumento da função supressora do p16 e p53 (ver adiante).

Observamos uma associação direta do p16 com a ciclina E. Esta última proteína promove fosforização e ativação da expressão gênica que levam a progressão da fase G1-S no ciclo celular, sendo associada à patogênese em alguns tumores como de mama, cólon, bexiga, pele, pulmão e neoplasias hematológicas (DONNELLAN e CHETTY 1999; MINELLA et al. 2008). Nos casos estudados 88,7% foram negativos para ciclina E, sugerindo que possivelmente a expressão e função da ciclina E é regulada negativamente nos pacientes que expressam p16. Sendo o p16 um dos principais inibidores da atividade do complexo de ciclina, sua ausência implica perda de um importante mecanismo de controle do ciclo celular. A restauração da expressão de p16 também é alvo de estudos, apresentando a capacidade de inibir o crescimento de células derivadas de diversos tumores, incluindo glioblastoma (HAMA et al. 2003; KIM et al. 2003), de próstata (STEINER et al. 2000), de mama (CAMPBELL et al. 2000) e outros. Portanto, pacientes com tumores p16 negativos em LBPM poderão ser beneficiados com terapias que restaurem a expressão e função proteica deste gene, sendo também um provável alvo terapêutico.

Relatos da literatura apontam para a importância de alterações numéricas relacionadas ao braço curto do cromossomo 9 na patogênese do LBPM, por ativarem vias de sinalização que promovem a proliferação e a diferenciação celular, escape do

sistema imune e alterações epigenéticas (BENTZ et al. 2001; LENZ et al. 2008; STEIDL e GASCOYNE 2011; TWA e STEIDL 2014). O presente estudo avaliou a expressão proteica por IHQ de genes relacionados a esta alteração em 63 casos de LBPM procedentes de 5 instituições do Estado de São Paulo. Encontramos altas expressões proteicas destes marcadores, com destaque para os genes localizados na região 9p (94,9% para o JMJD2c; 90,3% para o JAK2 e 88,1% para o PDL1), corroborando achados moleculares de hiperexpressão para estes genes no LBPM (GREEN et al. 2010; RUI et al. 2010; TWA e STEIDL 2014).

Utilizamos a IHQ para detecção da expressão proteica destes marcadores, com achados favoráveis para o uso desta técnica em casos de LBPM. Salientam-se os benefícios da IHQ como um método barato, em comparação com outras técnicas, bem como a facilidade e segurança na utilização em amostras fixadas em formol e armazenadas em blocos de parafina. Quanto a avaliação técnica destes marcadores, destaca-se a imunomarcação nuclear forte e homogênea nas células neoplásicas para o JAK2, com muitos casos evidenciando pequenos linfócitos reacionais negativos (Figura 11). Apesar do JAK-2 ser uma proteína ancorada a membrana celular, este achado sugere possível ativação da via JAK-nuclear STAT-independente do JAK2 no LBPM (Figura 3), corroborando trabalhos que descrevem a ocorrência desta ativação em outras neoplasias (NILSSON et al. 2010; DAWSON et al. 2011; QIAN et al. 2011).

Avaliando as curvas de sobrevida, demonstramos que a positividade IHQ para JAK2 e PDL1 se correlacionou a um melhor prognóstico nos casos estudados. Ao término de 5 anos de seguimento, cerca de 65% dos pacientes que expressaram estes marcadores estavam vivos quando comparados a 0% dos casos negativos (JAK2 com

p=0,0009 e PDL1 com p=0,0007). Estes achados são ao mesmo tempo intrigantes, já que esperaríamos o contrário seguindo o raciocínio que a via JAK-STAT estaria ativada. Não obstante, a imunomarcação nuclear para o JAK2 muito provavelmente revela a importância da via JAK-nuclear frente a via JAK-STAT no LBPM. Tem-se associado a ativação da via nuclear a um fenótipo supressor tumoral para o JAK2, possivelmente por induzir a expressão de p53 (QIAN et al. 2011). Isto talvez justifique os achados estatísticos. O p53 desempenha uma função supressora tumoral por ativar reparo no DNA, controlar a progressão do ciclo celular e promover apoptose (SÁNCHEZ-BEATO et al. 2003; FRITZ e FAJAS 2010). Encontramos 76,2% dos casos positivos para este marcador. Quando avaliamos o Quadro 8, observamos associações direta do p53 com MDM2 e inversas com p21 e p27. A maioria dos casos foram negativos para estes três últimos marcadores e houve associação estatística direta entre eles. Estas interações demonstram uma complexa relação na expressão proteica destas proteínas, com provável ativação do p53 em LBPM. Possivelmente ele bloqueia a progressão do ciclo celular (inativação do p21) e não sofre influência do MDM2, seu regulador negativo direto. Já o p27, que tem função supressora tumoral por também bloquear a progressão do ciclo celular, não teria papel importante como supressor nos casos de LBPM estudados.

Quando se correlaciona a expressão proteica do JAK2 e PDL1 às proteínas relacionadas ao ciclo e proliferação celular testadas, houve significância estatística com o p16 (JAK2 com p=0,02 e PDL1 com p=0,006), topoisomerase IIa (JAK2 com p=0,004 e PDL1 com p=0,0004) e Ki-67 (JAK2 com p=0,002 e PDL1 com p=0,001). A associação com os dois últimos marcadores explica-se tanto pela ativação da via JAK-STAT, que promove sinalização para proliferação celular, provavelmente,

associada à hiperexpressão do JAK2, como por alterações no microambiente tumoral provocadas pela provável hiperexpressão de PDL1, que bloqueia a resposta imune via linfócito T do hospedeiro, favorecendo a proliferação celular (MEIER et al. 2009; HUTCHINSON e WANG 2011). Estes achados corroboram a expectativa de que estes marcadores alterados no LBPM poderão constituir possíveis biomoléculas, distinguindo grupos de pacientes com a expectativa do uso de imunoterapia isolada ou associada (WALZ et al. 2006; RUI et al. 2010; YOUNES et al. 2012; RITZ et al. 2013; HANNA et al. 2014; HAO et al. 2014; HATZIMICHAEL et al. 2014; HAMLIN 2014; LINES et al. 2014; TWA e STEIDL 2014; TWA et al. 2014; WAGNER 2014).

Embora tenhamos detectado ganhos no cromossomo 9p, através da sonda comercial JAK2 (9p24) *Break* (Kreatech Diagnostics®), os achados não se correlacionaram a nenhum marcador IHQ, dados clínicos ou curva de sobrevivência. Estas alterações foram encontradas em 30,8% dos casos estudados (n=12 / 39), que, apesar da utilização de uma sonda monogênica comercial, são índices semelhantes aos detectados quando do emprego de sondas *in house* na literatura para FISH. MEIER et al. (2009), utilizando uma sonda *in house* para JAK2, encontraram ganhos de 9p em 35% (n=6 / 17) dos casos estudados em amostras de TMA. Neste estudo foi considerado ganho a presença de 3 ou mais sinais, em mais de 5% das células avaliadas. Considerando que foram utilizados como critérios para ganhos, no presente trabalho, a presença de 3 ou mais sinais em pelo menos 20% das células, conclui-se que é pertinente a utilização desta sonda como uma ferramenta auxiliar para comprovação citogenética de alterações no 9p em LBPM. Assim como MEIER et al. (2009), também não foi encontrado nenhuma translocação associada ao JAK2

nos casos estudados. Atribuimos a utilização de amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, o tempo de armazenamento, a escassa representatividade de tecido em alguns casos e a utilização de uma sonda monogênica, sem marcação centromérica concomitante, como fatores contribuintes para as falhas no emprego desta técnica (nesta casuística 24 / 63 (38%) das reações “não funcionaram”). Nesse contexto, atribuimos a não correlação estatística entre a presença de amplificação e a hiperexpressão IHQ ao pequeno número de casos detectados.

Quanto aos achados clínicos / evolutivos, descrições de que o LBPM acomete preferencialmente adultos jovens, com mediana de idade de 35 anos, predominando no sexo feminino (2:1), com sobrevida em 5 anos de 65%, doença comumente restrita ao mediastino na maioria dos casos, sendo que o envolvimento sistêmico além do tórax e estágio Ann Arbor III/IV são incomuns ao diagnóstico inicial (SAVAGE 2006, GAULARD et al. 2008, MARTELLI et al. 2008; STEIDL e GASCOYNE 2011; DABROWSKA-IWANICKA e WALEWSKI 2014). AOKI et al. (2014) em uma casuística de LBPM japonesa, associaram valor prognóstico e impacto terapêutico à ocorrência de derrame pleural ou pericárdico nos casos diagnosticados. Estes pacientes se beneficiaram com terapia mais agressiva em comparação com os demais casos. No presente trabalho, a casuística apresentada também foi de pacientes jovens (mediana de 30 anos), porém, sem predominância de gênero e com 57,3% dos pacientes vivos durante um seguimento médio de 63,9 meses neste grupo. A maioria destes pacientes (79,4%) foi diagnosticada com *bulky* mediastinal, doença restrita ao mediastino em 68,3% dos casos e baixo estágio clínico (Ann Arbor I ou II) em 59,1%. Tanto estágio clínico alto (40,9% dos casos Ann Arbor III ou IV) quanto IPI alto (40,6% dos casos risco intermediário alto ou

alto risco) correlacionaram-se à progressão da doença e óbito (estádio com $p=0,0015$ e IPI com $p=0,0001$). Em análise multivariada, estes dois parâmetros também foram fatores independentes de prognóstico ($p<0,0001$), em que, para o estágio clínico agrupado, pacientes com estágio III-IV possuem aproximadamente 20 vezes mais risco de óbito quando comparados aos com estágio I-II. Já para o IPI, o aumento de um grau (IPI 1 para 2) aumenta o risco de óbito por um fator de 6,9 vezes. Achados de estágio clínico alto nesta casuística, divergem um pouco os da literatura que apontam a ocorrência em menos de 30% dos casos (JOHNSON et al. 2008; DUNLEAVY et al. 2013). Aqui, 40,9% dos pacientes foram Ann Arbor III ou IV e, muito provavelmente, o retardo em buscar um serviço médico deve ter influenciado no estágio clínico, conforme relatado em pacientes com linfoma difuso de grandes células B em nosso meio (XAVIER et al, 2014). Contudo, pela topografia e o crescimento da massa mediastinal, compartilhamos também da opinião que em muitos casos é difícil a distinção entre o estágio II vs IV (disseminação vs invasão de estruturas adjacentes). Dezenove casos (30,2%) possuíam estágio IV ao diagnóstico, sendo que destes 6/19 (31,6%) possuíam comprometimento pulmonar e 2/19 (10,5%) lesão cardíaca / pericárdica. Como descrito na literatura, a ocorrência de doença fora da topografia torácica é rara ao diagnóstico (GAULARD et al. 2008). Nos casos estudados, dentre os 19 com estágio IV, foi descrito 1 (5,2%) com lesão hepática, 1 (5,2%) com lesão renal e 1 (5,2%) com lesão no sistema nervoso central ao diagnóstico. Recentemente, PAPAGEORGIOU et al. (2014) descreveram acometimento gástrico ao diagnóstico em pacientes gregos com LBPM. Portanto, apesar de raro, o diagnóstico diferencial de LBPM deverá ser cogitado diante de achados histológicos e clínicos compatíveis, em processos linfoproliferativos extra-

ganglionares de alto grau e com imunofenótipo B. Neste contexto, levantamos ainda a discussão para o critério de exclusão adotado, de acometimento da medula óssea ao diagnóstico. A WHO 2008 (JAFFE 2008) descreve que pacientes com massa mediastinal e acometimento da medula óssea (estádio IV), provavelmente, devem corresponder a casos de LDGCB com acometimento mediastinal secundário e não primário. Dois (2,27%), dos 88 casos levantados no período, foram excluídos por este critério. Sugerimos que, da mesma forma que o acometimento de órgãos extratorácicos seja possível ao diagnóstico de LBPM, o acometimento da medula óssea faça parte da progressão da doença mediastinal, não sendo um critério fidedigno para exclusão de LBPM.

Os achados histológicos foram variáveis, porém em nenhum caso encontramos alterações divergentes das clássicas descritas na literatura (GAULARD et al. 2008; MARTELLI et al. 2008). Chama atenção à presença de células *Hodgkin-like* em alguns casos que poderiam ser morfológicamente caracterizados como LHC (PAULLI et al. 1999; GAULARD et al. 2008). Esta semelhança morfológica correlaciona-se às semelhanças descritas no âmbito molecular entre o LBPM e LHC (SHIPP et al. 2002; SAVAGE et al. 2003; SAVAGE 2006). Para diferenciação, o estudo IHQ é fundamental ao demonstrar que estas células possuem imunomarcção forte e difusa para CD20. Outro diagnóstico diferencial importante e difícil para este contexto de semelhanças morfológicas, IHQ, moleculares e clínicas, seria o linfoma de células B, inclassificável, com aspectos intermediários entre LDGCB e LHC (JAFFE et al. 2008). Compartilhamos do pensamento que estes, na verdade, seriam descrições de aspectos intermediários entre dois polos, de um lado o LBPM e no outro o LHC. A interseção de achados histológicos e IHQ poderiam ser atribuídos à

amostragem avaliada e as variações moleculares correlacionadas ao binômio neoplasia-hospedeiro, tornando possível suspeita-se de três diagnósticos histológicos para o mesmo caso (LBPM, LHC ou linfoma de células B, inclassificável, com aspectos intermediários entre LDGCB e LHC). Neste cenário, destacamos a importância de estudos como este que buscam caracterizar novos achados que, correlacionados a outros já descritos, poderiam distinguir estas entidades e possibilitar uma conduta terapêutica específica.

Os casos foram tratados com diversos esquemas de QT, sendo que o esquema R-CHOP foi utilizado em 42,1% dos casos, CHOP em 36,8% dos casos e outros esquemas em 21,1% dos casos. Quando analisamos o desfecho é perceptível a melhor resposta terapêutica ao esquema R-CHOP, com remissão completa em 75% dos pacientes após o término do tratamento inicial. Em contrapartida, pacientes submetidos ao esquema CHOP e a outros esquemas terapêuticos, apresentaram remissão completa em apenas 38,1% e 33,3% dos casos, respectivamente. Agrupando os pacientes tratados com R-CHOP vs CHOP/CHOP-SÍMILE, o primeiro grupo obteve melhor sobrevida global quando comparado ao segundo ($p=0,0121$) (Figura 22). Estes dados corroboram a eficácia do uso do R-CHOP não só para o LDGCB como também para o LBPM (ZINZANI et al. 2009; RIEGER et al. 2011; VASSILAKOPOULOS et al. 2012; DUNLEAVY et al. 2013), podendo ser o esquema inicial de eleição para estes doentes. Entretanto, não há ainda na literatura um consenso para o tratamento padrão no LBPM. Apesar da boa resposta ao esquema R-CHOP, cerca de 30% dos pacientes evoluem com progressão ou recaída necessitando de RT consolidativa ou esquemas mais intensos. Nesta casuística, a RT foi empregada em 47,6% dos casos sempre como terapia de consolidação ou nos

casos com resposta parcial ao primeiro esquema de QT instituído. DUNLEAVY et al. (2013) propõem o uso de DA-EPOCH-R como um possível tratamento padrão em LBPM. Referem que este esquema possui toxicidade semelhante aos demais, aumenta a taxa de sobrevida livre de doença, diminui as taxas de recidiva e reduz drasticamente o uso de RT nestes doentes. Neste contexto, sugere-se novos estudos prospectivos que possam agregar fatores prognósticos (clínicos e IHQ) na estratificação de pacientes com LBPM, associando estes grupos a estratégias terapêuticas distintas que possam otimizar custos, diminuir efeitos adversos, melhorar sobrevida e diminuir recidiva.

Intrigantemente, raça negra foi um fator independente associado a pior sobrevida ($p < 0,0001$), com 9,64 vezes mais risco de óbito que os pacientes da raça branca. Avaliando a Tabela 7 que mostra as características clínicas e evolutivas dos 5 casos (7,9%) com este critério, observamos que se tratam de pacientes em média maiores que 50 anos, com estágio clínico e IPI altos, na maioria tratados com CHOP e com seguimento clínico curto. Não há nenhum relato na literatura para esta associação em LBPM. Recentemente SHIN et al. (2014), relataram o impacto negativo na sobrevida de pacientes masculinos negros com câncer de mama em uma casuística com 4279 homens nos Estados Unidos da América. Outros estudos também revelam possível associação com pior sobrevida em pacientes da raça negra com câncer de endométrio e próstata (ELSHAIKH et al. 2013; MAHAL et al. 2014). Contudo, para esta casuística de LBPM, não podemos descartar um viés de seleção como possível responsável pela associação estatística. Todos estes pacientes são originados do Sistema Único de Saúde Brasileiro, esbarrando em inúmeros fatores que retardam o diagnóstico e tratamento. Neste aspecto, observa-se que 4 / 5 casos

morreram em no máximo 8 meses após o diagnóstico. O pequeno número de casos também é um fator a ser considerado. Há necessidade de um número maior de estudos que possam avaliar a reprodutibilidade deste achado em casuísticas distintas e com maior número de pacientes.

No âmbito nacional, MELLO em 2010 descreveu aspectos clínicos e evolutivos de 44 pacientes diagnosticados no ACCCC no período de 1989 a 2007 com achados semelhantes aos aqui descritos. DE MELLO et al. (2011), utilizando 22 casos desta mesma casuística que possuíam materiais biológicos fixados em formol e embebidos em parafina, concluíram que a positividade para MUM1 foi um fator prognóstico adverso ($p=0,002$). O MUM1 está associado a diferenciação linfóide, sobretudo para o polo plasmocitário. Funciona como um importante regulador da expressão gênica mediada por interferons e outras citocinas (FALINI et al. 2000). O presente trabalho incluiu alguns destes casos anteriormente descritos, entretanto, por não ser objeto de estudo, o MUM1 bem como a classificação de HANS e derivadas não foram avaliadas. Não obstante, sugere-se a inclusão do MUM1 aos demais aqui descritos (p16, JAK2 e PDL1) para estratificação de grupos prognósticos em LBPM. Com a inclusão de novos casos do próprio hospital somados aos de outros centros, a presente casuística ganha notória importância servindo de referência na caracterização do LBPM em nosso país e na América do Sul.

Em resumo, descrevemos características clínicas, evolutivas, terapêuticas e IHQ em 63 casos de LBPM. Ressaltamos a utilidade da IHQ como ferramenta acessível para a seleção de pacientes com marcadores proteicos favoráveis ao prognóstico (JAK2, PDL1 e p16), bem como a eficácia do esquema R-CHOP no tratamento inicial da maioria dos casos de LBPM. Sugerimos um modelo

prognóstico que estratifica os pacientes em dois grupos distintos de evolução clínica, com base na presença ou ausência dos parâmetros que aqui se correlacionaram a prognóstico (Figura 21). Para tanto, reiteramos a necessidade de mais estudos que possam aplicar os achados demonstrados isoladamente ou associados a outros da literatura em LBPM.

7 CONCLUSÕES

- O presente estudo demonstrou que a expressão por IHQ de marcadores recentemente associados à patogênese do LBPM e relacionados a alterações no cromossomo 9p, bem como marcadores associados à proliferação e ciclo celular, poderão ser utilizados como possíveis ferramentas auxiliares na estratificação de pacientes com LBPM em grupos prognósticos e terapêuticos. Pacientes com fatores prognósticos favoráveis possivelmente se beneficiarão de terapias menos agressivas, com menor custo e comorbidade. Pacientes com ausência de fatores prognósticos favoráveis poderão se beneficiar com terapias mais agressivas, aumentando a sobrevida e diminuindo as chances de recidivas;
- O esquema R-CHOP possui maior eficácia e taxa de remissão em LBPM, podendo ser utilizado como terapia inicial;
- A amplificação de 9q ocorreu em 12/39 casos avaliáveis (30,8%), frequência semelhante à da literatura quando empregada a técnica de FISH; não foi observada correlação entre a amplificação e a expressão das proteínas estudadas, nem com a sobrevida dos pacientes;
- Houve frequente associação entre os marcadores de proliferação e de ciclo celular entre si e com os relacionados ao 9p;
- A hiperexpressão IHQ do p16 corresponde a um marcador biomolecular isolado robusto associado a melhor prognóstico em LBPM; Pacientes p16

negativos poderão ser beneficiados com terapias que restabeleçam a expressão / função proteica deste gene;

- A expressão nuclear de JAK2 provavelmente está associada a ativação da via JAK-nuclear. Esta possivelmente confere ao JAK2 um fenótipo supressor tumoral nos casos de LBPM estudados;
- A expressão IHQ de JAK2, PDL1 e p16, associadas a estágio clínico e IPI baixos (I ou II e 1 ou 2, respectivamente), são fatores prognósticos relacionados à sobrevida global mais favorável e poderão integrar um modelo preditor em LBPM para seleção de pacientes em grupos prognósticos e terapêuticos; a IHQ poderá ser utilizada como ferramenta auxiliar acessível na detecção da expressão proteica de JAK2 e PDL1, estratificando pacientes que poderão ser potencialmente beneficiados com terapias alvos / imunoterapia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Anonymous]. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. **N Engl J Med** 1993; 329:987-94.

[Anonymous]. IL-6 Pathway [2014]. Available from: <URL:<http://www.sabiosciences.com/iapp/il6.html> [2014 dez 12].

Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. **Science** 2002; 296:1653-5.

Addis BJ, Isaacson PG. Large cell lymphoma of the mediastinum: a B-cell tumour of probable thymic origin. **Histopathology** 1986; 10:379-90.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. **Nature** 2000; 403:503-11.

Allred DC. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. **Mod Pathol** 2010; 2:S52-9.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med** 1997; 3:917-21.

Amen F, Horncastle D, Elderfield K, et al. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. **Histopathology** 2007; 51:70-9.

Aoki T, Izutsu K, Suzuki R, et al. Prognostic significance of pleural or pericardial effusion, and the implication of optimal treatment in primary mediastinal large B-cell lymphoma: a multicenter retrospective study in Japan. **Haematologica** 2014; 99:1-36.

Barber BR, Biron VL, Klimowicz AC, et al. Molecular predictors of locoregional and distant metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **J Otolaryngol Head Neck Surg** 2013; 16:42-53.

Barth TF, Leithäuser F, Joos S, Bentz M, Möller P. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? **Lancet Oncol** 2002; 3:229-34.

Bea S, Zetti A, Wright G, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. **Blood** 2005; 106:3183-90.

Bentz M, Barth TF, Bruderlein S, et al. Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 4:393-401.

Bishop PC, Wilson WH, Pearson D, Janik J, Jaffe ES, Elwood PC. CNS involvement in primary mediastinal large B-cell lymphoma. **J Clin Oncol** 1999; 17:2479-85.

Cairolì R, Grillo G, Tedeschi A, et al. Efficacy of an early intensification treatment integrating chemotherapy, autologous stem cell transplantation and radiotherapy for poor risk primary mediastinal large B cell lymphoma with sclerosis. **Bone Marrow Transplant** 2002; 29:473-7.

Calaminici M, Piper K, Lee AM, Norton AJ. CD23 expression in mediastinal large B-cell lymphomas. **Histopathology** 2004; 45:619-24.

Calvo KR, Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Jaffe ES. Molecular profiling provides evidence of primary mediastinal large B-cell lymphoma as a distinct entity related to classic Hodgkin lymphoma: implications for mediastinal gray zone lymphomas as an intermediate form of B-cell lymphoma. **Adv Anat Pathol** 2004; 11:227-38.

Campbell I, Magliocco A, Moyana T, Zheng C, Xiang J. Adenovirus-mediated p16INK4a gene transfer significantly suppresses human breast cancer growth. **Cancer Gene Ther** 2000; 7:1270-8.

Cazals-Hatem D, Lepage E, Brice P, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 141 cases compared with 916 nonmediastinal large B-cell lymphomas, a GELA ("Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte") study. **Am J Surg Pathol** 1996; 20:877-88.

Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, et al. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. **J Immunol** 2004; 173:945-54.

Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. **Clin Cancer Res** 2009; 15:5494-502.

Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood** 2003; 101:78-84.

Copie-Bergman C, Plonquet A, Alonso MA, et al. MAL expression in lymphoid cells: further evidence for MAL as a distinct molecular marker of primary mediastinal large B-cell lymphomas. **Mod Pathol** 2002; 15:1172-80.

Dabrowska-Iwanicka A, Walewski JA. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Curr Hematol Malig Rep** 2014; 9:273-83.

Davis RE, Dorfman RF, Warnke RA. Primary large-cell lymphoma of the thymus: a diffuse B-cell neoplasm presenting as primary mediastinal lymphoma. **Hum Pathol** 1990; 21:1262-8.

Dawson MA, Bannister AJ, Saunders L, et al. Nuclear JAK2. **Blood** 2011; 118:6987-8.

De Leeuw RJ, Davies JJ, Rosenwald A, et al. Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. **Hum Mol Genet** 2004; 13:1827-37.

De Mello CA, De Andrade VP, De Lima VC, et al. Prognostic impact of MUM1 expression by immunohistochemistry on primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Leuk Lymphoma** 2011; 52:1495-503.

Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. **FASEB J** 1999; 13:773-80.

Dunleavy K, Pittaluga S, Maeda LS, et al. Dose-adjusted EPOCH-rituximab therapy in primary mediastinal B-cell lymphoma. **N Engl J Med** 2013; 368:1408-16.

Dunphy CH, O'Malley DP, Cheng L, Fodrie TY, Perkins SL, Kaiser-Rogers K. Primary mediastinal B-cell lymphoma: detection of BCL2 gene rearrangements by PCR analysis and FISH. **J Hematop** 2008; 1:77-84

Elshaikh MA, Munkarah AR, Robbins JR, et al. The impact of race on outcomes of patients with early stage uterine endometrioid carcinoma. **Gynecol Oncol** 2013; 128:171-4.

Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. **Blood** 2000; 95:2084-92.

Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. **J Clin Oncol** 2005; 23:4117-26.

Fritz V, Fajas L. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. **Oncogene** 2010; 29:4369-77.

Gaulard P, Harris NL, Pileri, et al. Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, editors. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4th ed. Lyon: IARC; 2008. p.250-1.

Green MR, Monti S, Rodig SJ, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Blood** 2010; 116:3268-77.

Haarer CF, Roberts RA, Frutiger YM, et al. Immunohistochemical classification of de novo, transformed, and relapsed diffuse large B-cell lymphoma into germinal center B-cell and nongerminal center B-cell subtypes correlates with gene expression profile and patient survival. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:1819-24.

Hama S, Matsuura S, Tauchi H, et al. p16 Gene transfer increases cell killing with abnormal nucleation after ionising radiation in glioma cells. **Br J Cancer** 2003; 89:1802-11.

Hamlin PA, Portlock CS, Straus DJ, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma: optimal therapy and prognostic factor analysis in 141 consecutive

patients treated at Memorial Sloan Kettering from 1980 to 1999. **Br J Haematol** 2005; 130:691-9.

Hamlin PA. Evolving treatment paradigms for primary mediastinal diffuse large B-cell lymphoma. **J Clin Oncol**. 2014; 32:1751-3.

Hanna DM, Fellowes A, Vedururu R, et al. A unique case of refractory primary mediastinal B-cell lymphoma with JAK3 mutation and the role for targeted therapy. **Haematologica** 2014; 99:e156-8.

Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. **Blood** 2004; 103:275-82.

Hao Y, Chapuy B, Monti S, et al. Selective JAK2 inhibition specifically decreases Hodgkin lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma growth in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res** 2014; 20:2674-83.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood** 1994; 84:1361-92.

Hatzimichael E, Tsolas E, Briasoulis E. Profile of pacritinib and its potential in the treatment of hematologic disorders. **J Blood Med** 2014; 5:143-52.

Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. **Ann Intern Med** 2010; 152:444-55.

Hutchinson CB, Wang E. Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: a short review with brief discussion of mediastinal gray zone lymphoma. **Arch Pathol Lab Med** 2011; 135:394-8.

Iqbal J, Greiner TC, Patel K, et al. Leukemia/Lymphoma molecular profiling project. distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. **Leukemia** 2007; 21:2332-43.

Isaacson PG, Norton AJ, Addis BJ. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. **Lancet** 1987; 26:1488-91.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, editors, et al. **World Health Organization Classification of Tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC; 2001. p.175-6.

Jaffe ES, Stein H, Swerdlow SH, et al. B-cell lymphoma, unclassifiable with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, editors, et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4th ed. Lyon: IARC; 2008. p.267-8.

Jay J, Hammer A, Nestor-Kalinoski A, Diakonova M. JAK2 tyrosine kinase phosphorylates and is negatively regulated by centrosomal protein Ninein. **Mol Cell Biol** 2015; 35:111-31.

Johnson PW; Davies AJ. Primary mediastinal B-cell lymphoma. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 2008; 349-58.

Joos S, Otaño-Joos MI, Ziegler S, et al. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. **Blood** 1996; 87:1571-8.

Kim SK, Wang KC, Cho BK, et al. Adenoviral p16/CDKN2 gene transfer to malignant glioma: role of p16 in growth, invasion, and senescence. **Oncol Rep** 2003; 10:1121-6.

Kimm LR, de Leeuw RJ, Savage KJ, et al. Frequent occurrence of deletions in primary mediastinal B-cell lymphoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2007; 46:1090-7.

Lauren O. **Cell growth control**. Feb. 2012. Available from: <URL:<https://www.studyblue.com/notes/n/neoplasia-vii-cancer-critical-genesandfamilial-cancer-syndromes/deck/2282171>. [2014 dez 12]

Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105:13520-5.

Lichtenstein AK, Levine A, Taylor CR, et al. Primary mediastinal lymphoma in adults. **Am J Med** 1980; 68:509-14.

Lines JL, Sempere LF, Broughton T, et al. VISTA is a novel broad spectrum negative checkpoint regulator for cancer immunotherapy. **Cancer Immunol Res** 2014; 2:510-7.

Lukes RJ, Collins RD. Immunological characteristics of human malignant lymphomas. **Cancer** 1974; 34: 1488-503.

Mahal BA, Aizer AA, Ziehr DR, et al. Trends in disparate treatment of African American men with localized prostate cancer across National Comprehensive Cancer Network risk groups. **Urology** 2014; 84:386-92.

Malpeli G, Barbi S, Moore PS, et al. Primary mediastinal B-cell lymphoma: hypermutation of the BCL6 gene targets motifs different from those in diffuse large B-cell and follicular lymphomas. **Haematologica** 2004; 89:1091-9.

Martelli M, Ferreri AJ, Johnson P. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Crit Rev Oncol Hematol** 2008; 68:256-63.

Meier C, Hoeller S, Bourgau C, et al. Recurrent numerical aberrations of JAK2 and deregulation of the JAK2-STAT cascade in lymphomas. **Mod Pathol** 2009; 22:476-87.

Mello CAL. **Análise de CD10, BCL-6 e MUM1 em linfomas não Hodgkin de células B primários de mediastino**. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Universidade de São Paulo].

Melzner I, Bucur AJ, Bruderlein S, et al. Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. **Blood** 2005; 105:2535-42.

Menestrina F, Chilosi M, Bonetti F, et al. Mediastinal large-cell lymphoma of B-type, with sclerosis: histopathological and immunohistochemical study of eight cases. **Histopathology** 1986; 10:589-600.

Miller JB, Variakojis D, Bitran JD, et al. Diffuse histiocytic lymphoma with sclerosis: a clinicopathologic entity frequently causing superior venacaval obstruction. **Cancer** 1981; 47:748-56.

Minella AC, Loeb KR, Knecht A, et al. Cyclin E phosphorylation regulates cell proliferation in hematopoietic and epithelial lineages in vivo. **Genes Dev** 2008; 22:1677-89.

Möller P, Lämmler B, Eberlein-Gonska M, et al. Primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** 1986; 409:79-92.

Möller P, Moldenhauer G, Momburg F, et al. Mediastinal lymphoma of clear cell type is a tumor corresponding to terminal steps of B cell differentiation. **Blood** 1987; 69:1087-95.

Möller P, Hofmann WJ, Mielke B, et al. Primary mediastinal, clear cell B-cell lymphoma is an epithelium-associated thymus lymphoma. **Pathologe** 1989; 10:234-9.

Moreira AH. **Detecção de vírus oncogênicos (EBV, HHV8 e SV40) em linfomas humanos e correlação com dados clinicopatológicos**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. **J Clin Oncol** 2008; 26:447-54.

Nguyen LN, Ha CS, Hess M, et al. The outcome of combined-modality treatments for stage I and II primary large B-cell lymphoma of the mediastinum. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2000; 47:1281-5.

Nieder C, Schill S, Kneschaurek P, et al. Comparison of three different mediastinal radiotherapy techniques in female patients: Impact on heart sparing and dose to the breasts. **Radiother Oncol** 2007; 82:301-7.

Nilsson J, Helou K, Kovács A, et al. Nuclear Janus-activated kinase 2/nuclear factor1-C2 suppresses tumorigenesis and epithelial-to-mesenchymal transition by repressing Forkhead box F1. **Cancer Res** 2010; 70:2020-9.

Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. **Blood** 2007; 109:4930-5.

Non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. **Cancer** 1982; 49:2112.

Ott G, Ziepert M, Klapper W, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. **Blood** 2010; 116:4916-25.

Papageorgiou SG, Sachanas S, Pangalis GA, et al. Gastric involvement in patients with primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Anticancer Res** 2014; 34:6717-23.

Paulli M, Sträter J, Gianelli U, et al. Mediastinal B-cell lymphoma: a study of its histomorphologic spectrum based on 109 cases. **Hum Pathol** 1999; 30:178-87.

Pileri SA, Gaidano G, Zinzani PL, et al. Primary mediastinal B-cell lymphoma: high frequency of BCL-6 mutations and consistent expression of the transcription factors OCT-2, BOB.1, and PU.1 in the absence of immunoglobulins. **Am J Pathol** 2003; 162:243-53.

Qian CJ, Yao J, Si JM. Nuclear JAK2: form and function in cancer. **Anat Rec** 2011; 294:1446-59.

Rappaport H. **Atlas of tumor pathology**. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1966. Tumors of the hematopoietic system; p.91-206.

Rieger M, Osterborg A, Pettengell R, et al. MabThera International Trial (MInT) Group. Primary mediastinal B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: results of the Mabthera International Trial Group study. **Ann Oncol** 2011; 22:664-70.

Reinhardt HC, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. **Trends Genet** 2012; 28:128-36.

Ritz O, Guiter C, Castellano F, et al. Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma. **Blood** 2009; 114:1236-42.

Ritz O, Rommel K, Dorsch K, et al. STAT6-mediated BCL6 repression in primary mediastinal B-cell lymphoma (PMBL). **Oncotarget** 2013; 4:1093-102.

Rocco JW, Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. **Exp Cell Res** 2001; 264:42-55.

Rodig SJ, Savage KJ, LaCasce AS, et al. Expression of TRAF1 and nuclear c-Rel distinguishes primary mediastinal large cell lymphoma from other types of diffuse large B-cell lymphoma. **Am J Surg Pathol** 2007; 31:106-12.

Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. **J Exp Med** 2003; 198:851-62.

Rui L, Emre NC, Kruhlak MJ, et al. Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. **Cancer Cell** 2010; 18:590-605.

Sánchez-Beato M, Saez AI, Navas IC, et al. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16, and p27. **Am J Pathol** 2001; 159:205-13.

Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. **Blood** 2003; 101:1220-35.

Savage KJ, Monti S, Kutok JL, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. **Blood** 2003; 102:3871-9.

Savage KJ. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Oncologist** 2006; 11:488-95.

Scarpa A, Moore PS, Rigaud G, et al. Molecular features of primary mediastinal B-cell lymphoma: involvement of p16INK4A, p53 and c-myc. **Br J Haematol** 1999; 107:106-13.

Scarpa A, Moore PS, Rigaud G, Menestrina F. Genetic alterations in primary mediastinal B-cell lymphoma: an update. **Leuk Lymphoma** 2001; 4:47-53.

Sedek M, Strous GJ. SUMOylation is a regulator of the translocation of Jak2 between nucleus and cytosol. **Biochem J** 2013; 453:231-9.

Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. **Blood** 2007; 109:1857-61.

Shin JY, Kachnic LA, Hirsch AE. The impact of race in male breast cancer treatment and outcome in the United States: a population-based analysis of 4,279 patients. **Int J Breast Cancer** 2014; 2014:1-14.

Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. **Nat Med** 2002; 8:68-74.

Steidl C, Gascoyne RD. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Blood** 2011; 118:2659-69.

Steiner MS, Zhang Y, Farooq F, Lerner J, Wang Y, Lu Y. Adenoviral vector containing wild-type p16 suppresses prostate cancer growth and prolongs survival by inducing cell senescence. **Cancer Gene Ther** 2000; 7:360-72.

Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P, et al. Mediastinal gray zone lymphoma: the missing link between classic Hodgkin's lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1411-21.

Trump DL, Mann RB. Diffuse large cell and undifferentiated lymphomas with prominent mediastinal involvement. **Cancer** 1982; 50:277-82.

Twa DD, Steidl C. Structural genomic alterations in primary mediastinal large B-cell Lymphoma. **Leuk Lymphoma** 2014; 13:1-27.

Twa DD, Chan FC, Ben-Neriah S, et al. Genomic rearrangements involving programmed death ligands are recurrent in primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Blood** 2014; 123:2062-5.

Van Besien K, Kelta M, Bahaguna P. Primary mediastinal B-cell lymphoma: a review of pathology and management. **J Clin Oncol** 2001; 19:1855-64.

Vassilakopoulos TP, Pangalis GA, Katsigiannis A, et al. Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone with or without radiotherapy in primary mediastinal large B-cell lymphoma: the emerging standard of care. **Oncologist** 2012; 17:239-49.

Wagner SD. Targeting primary mediastinal B-cell lymphoma. **Oncotarget** 2014; 5:6552-3.

Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, et al. Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. **J Biol Chem** 2006; 281:18177-83.

Woessmann W, Lisfeld J, Burkhardt B; NHL-BFM Study Group. Therapy in primary mediastinal B-cell lymphoma. **N Engl J Med** 2013; 369:282.

Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers. **J Clin Oncol** 2008; 26: 2717-24.

Xavier FD, Levy D, Pereira J. Time-to-treatment of diffuse large B-cell lymphoma in São Paulo. **Clinics (Sao Paulo)** 2014; 69:367-71.

Xu LM, Fang H, Wang WH, et al. Prognostic significance of rituximab and radiotherapy for patients with primary mediastinal large B-cell lymphoma receiving doxorubicin-containing chemotherapy. **Leuk Lymphoma** 2013; 54:1684-90.

Younes A, Romaguera J, Fanale M, et al. Phase I study of a novel oral Janus kinase 2 inhibitor, SB1518, in patients with relapsed lymphoma: evidence of clinical and biologic activity in multiple lymphoma subtypes. **J Clin Oncol** 2012; 30:4161-7.

Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:798-809.

Zinzani PL, Martelli M, Magagnoli M, et al. Treatment and clinical management of primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: MACOP-B regimen and mediastinal radiotherapy monitored by (67) Gallium scan in 50 patients. **Blood** 1999; 94:3289-93.

Zinzani PL, Martelli M, Bendandi M, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: a clinical study of 89 patients treated with MACOP-B chemotherapy and radiation therapy. **Haematologica** 2001; 86:187-91.

Zinzani PL, Martelli M, Bertini M, et al. International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG). Induction chemotherapy strategies for primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: a retrospective multinational study on 426 previously untreated patient. **Haematologica** 2002; 87:1258-64.

Zinzani PL, Stefoni V, Finolezzi E, et al. Rituximab combined with MACOP-B or VACOP-B and radiation therapy in primary mediastinal large B-cell lymphoma: a retrospective study. **Clin Lymphoma Myeloma** 2009; 9:381-5.

Zouein FA, Duhé RJ, Booz GW. JAKs go nuclear: emerging role of nuclear JAK1 and JAK2 in gene expression and cell growth. **Growth Factors** 2011; 29:245-52.

Anexo 1 - Ficha de Coleta de Dados Clínicos

NÚMERO DO CASO:

NÚMERO DO PRONTUÁRIO:

NÚMERO (S) ANÁTOMO (S): (1) TMA (2) Corte inteiro [] corte

NOME:

1- PROCEDÊNCIA: (1) AC Camargo (2) Unicamp (3) Sta Casa (4) USP-SP (5)
Barretos_____ [] proced

2- SEXO: (1) Feminino (2) Masculino
_____ [] genero

3- RAÇA: (1) Branca (2) Negra (3) Asiática
_____ [] raça

DATA DO NASCIMENTO: / / **4- IDADE AO DIAGNÓSTICO (anos):**
_____ [] id_diag

DATA DO DIAGNÓSTICO: / /

5- DIAGNÓSTICO INICIAL: (1) Hodgkin (2) Não Hodgkin (3) Outro (99) DNI
_____ [] pri_diag

6- ESTÁDIO CLÍNICO:

(1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) IIIA (6) IIIB (7) IVA (8) IVB (99) DNI
_____ [] est_cli

7- BULKY: (0) Não (1) Sim (99) DNI
_____ [] bulky

8- SÍTIO: (1) Restrito ao mediastino (2) Mediastino + estruturas adjacentes (99)
DNI _____ [] sitio

9- ECOG: (0) 0 (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4) 4 (99) DNI
_____ [] ecog

10- IPI: (1) Baixo Risco (2) Risco Interm Baixo (3) Risco Interm Alto (4) Alto Risco (99)
DNI _____ [] ipi

11- LDH: (0) Normal (1) Elevado (> 450) (99) DNI
_____ [] ldh

12- HEMOGLOBINA: (1) < 10 (2) 10-12 (3) > 12 (99) DNI _____
_____ [] hb

13- SINTOMAS B: (0) Não (1) Sim (99) DNI
_____ [] sint_b

14- QUIMIOTERAPIA: (0) Não (1) Sim (99) DNI
_____ [] qt

15- QUIMIOTERAPIA TIPO:(1) CHOP (2) R-CHOP (3) Outra (88) Não se aplica
(99) DNI _____ [] qt_tipo

16- NÚMEROS DE CICLOS:

_____ [] qt_num

17- RADIOTERAPIA: (0) Não (1) Sim (99) DNI
 _____ [] rxt

18- RESPOSTA AO TRATAMENTO:

(1) Completa (2) Parcial (3) Progressão (99) DNI
 _____ [] resp_tto

19- RECIDIVA: (0) Não (1) Sim (88) Não se aplica (99) DNI
 _____ [] recid

DATA DO ÚLTIMO SEGUIMENTO: / /

20- FOLLOW-UP (meses):

_____ [] followup

21- SEGUIMENTO:

(1) Vivo c/ dça (2) Vivo s/ dça (3) Morte pela dça (4) Morte por outras causas (99) DNI
 _____ [] segue

IMUNOISTOQUÍMICA**22- P15**

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] p15_int

QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) > 50%
 _____ [] p15_%

23- P16

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] p16_int

QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) > 50%
 _____ [] p16_%

24- P21

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] p21_int

QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) > 50%
 _____ [] p21_%

25- P27

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] p27_int

QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) > 50%
 _____ [] p27_%

26- P53

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] p53_int
 QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
 50% _____ [] p53_%

27- P63

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] p63_int
 QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
 50% _____ [] p63_%

28- CICLINA D1

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] cicl_d1_int
 QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
 50% _____ [] cicl_d1_%

29- CICLINA D2

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] cicl_d2_int
 QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
 50% _____ [] cicl_d2_%

30- CICLINA D3

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] cicl_d3_int
 QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
 50% _____ [] cicl_d3_%

31- CICLINA E

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] cicl_e_int
 QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
 50% _____ [] cicl_e_%

32- MDM-2

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] mdm2_int
 QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
 50% _____ [] mdm2_%

33- TOPOISOMERASE-2a

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
 _____ [] top2a_int
 QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
 50% _____ [] top2a_%

34- Ki-67 (1) Baixo (<10%) (2) Moderado (10-50%) (3) Alto (>50%)
 _____ [] ki_67

35- JMJD2c

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
_____ [] jmjd2c_int

QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
50% ____ [] jmjd2c_%

36- SOCS1

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
_____ [] socs1_int

QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
50% ____ [] socs1_%

37- STAT6

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
_____ [] stat6_int

QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
50% ____ [] stat6_%

38- JAK2

INTENSIDADE: (0) Negativo (1) Leve (2) Moderado (3) Intenso
_____ [] jak2_int

QUANTIDADE: (0) Negativo (1) 1 a 5% (2) 6 a 20% (3) 21 a 50% (4) >
50% ____ [] jak2_%

39- FISH (0) Negativo (1) Positivo (2) Não avaliado
_____ [] fish

Número de cópias: []

Anexo 2 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 04 de março de 2013.

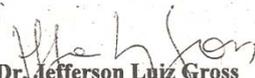
Ao
Dr. José Vassallo.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1552/11
“Caracterização da expressão protéica dos marcadores relacionados à proliferação celular nos linfomas de grandes células B primários do mediastino e sua relação com fatores clínicos e patológicos”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 26/02/2013, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Comunicado sobre mudança de nível de mestrado para doutorado do aluno Carlos Augusto Moreira Silva, datado de 20 de janeiro de 2013;
- Emenda ao projeto com alteração de título, datada de 20 de janeiro de 2013.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa