

# **ANGIOGÊNESE E PROGNÓSTICO EM LINFOMA DE CÉLULAS DO MANTO**

**SÉRGIO AUGUSTO BUZIAN BRASIL**

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para  
obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**

**São Paulo**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente\***

B823    Brasil, Sérgio Augusto Buzian  
          **Angiogênese e prognóstico em linfoma de células do manto** / Sérgio Augusto  
          Buzian Brasil - São Paulo; 2020.  
          94p.  
          Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente  
          Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.  
          Orientador: Fernando Augusto Soares

          Descritores: 1. Inibidores da Angiogênese/Angiogenesis Inhibitors. 2. Prognóstico/  
          Prognosis. 3. Linfoma de Célula do Manto/Lymphoma, Mantle-Cell. 4. Imuno-  
          Histoquímica/Immunohistochemistry

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

\*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai (“*in memorian*”), minha mãe e minha avó Dora (“*in memorian*”) que me ensinaram os valores da conduta ética e do esforço pessoal na busca pelo que se deseja;

Aos meus sogros Luiz e Luizette pelo apoio e presença constantes;

Às minhas filhas Isabela e Sabrina cujos olhares, sorrisos e conversas à mesa me bastam para engrandecer a Alma demonstrar que tudo vale a pena;

À minha esposa Lucrécia – meu Norte; meu porto seguro.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Fernando Augusto Soares, meu orientador pela confiança que depositou em nossas ideias transformando-as em realidade;

Ao Dr. Carlos Chiattonne, Dra. Vania Hungria, Dr. Rodolfo Delfini Cançado , Dra. Teresa Cristina Bortolheiro e Dr. Roberto Antonio Pinto Paes pelos ensinamentos, apoio, coleguismo e auxílio desde os primeiros anos de Residência em Hematologia ;

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e à Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo onde convivo com pessoas pelas quais tenho profundo respeito e admiração ;

Ao A.C.Camargo Cancer Center pela oportunidade;

Aos nossos pacientes – mestres da vida, da humildade, da resignação e do afeto;

Às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho:

- à todos os profissionais do setor de Pós Graduação do A.C.Camargo Cancer Center que sempre me acolheram de modo prestativo e profissional,

aos funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center, pela execução das micromatizes teciduais ; em especial ao Dr. Felipe D’Almeida Costa pela ajuda inestimável.

- aos amigos pelo apoio em todas as horas desta longa jornada.

## RESUMO

Brasil SAB. **Angiogênese e prognóstico em linfoma de células do manto.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

**INTRODUÇÃO:** Fatores prognósticos em Linfoma de Células do Manto (LCM) foram definidos em época sem padronização de tratamento e menos conhecimento de patogenia. Entre estes conhecimentos a participação da angiogênese ainda tem sido pouco estudada. Assim, a identificação de novos fatores prognósticos e melhor definição do impacto da angiogênese no LCM podem auxiliar na terapêutica e caracterizar grupos com maior risco de óbito.

**OBJETIVO:** Avaliar a microdensidade vascular (MDV) em pacientes com LCM tratados no A.C.Camargo Cancer Center e relacioná-la a fatores que impactem na sobrevida global(SG).

**MATERIAL E MÉTODOS:** Estudo retrospectivo, unicêntrico, transversal em portadores de LCM não indolente em cujas amostras histológicas foi quantificada MDV através de CD34 e avaliada angiogênese através de HIF- $\alpha$  e VEGF. Também foram consideradas variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais, índices prognósticos e dados de tratamento e resposta ao tratamento. Modelo de riscos proporcionais de Cox simples foi ajustado para descrever a relação entre variáveis independentes e tempo até o óbito. Seleção das variáveis para modelo de regressão de Cox múltiplo foi considerada a partir dos resultados do modelo de Cox simples.

**RESULTADOS:** No período de 2006 a 2014 analisamos 63 pacientes. A maioria foi do sexo masculino (68.3%) com estágio IV (81%). A mediana de idade foi de 64 anos e mediana de MIPI e MIPI-b de 5,7 e 6,2 respectivamente. Citarabina em alta dose foi utilizada em 44,4% dos pacientes e 36,5 % dos pacientes realizaram TACTH. O tempo mediano de seguimento foi 72,34 meses e a mediana de sobrevida global (SG) foi de 93,91 meses. Dos 63 pacientes iniciais, 34 dispunham de amostras para análise de MDV. A média e mediana de MDV foi de 14,88 e 3,5 vasos/mm<sup>2</sup> respectivamente e 64,71% dos pacientes apresentaram VEGF e HIF- $\alpha$   $\geq$  10%. Em análise univariada nenhum parâmetro de angiogênese apresentou significância estatística. Idade, hemoglobina, albumina, número de leucócitos, linfócitos, plaquetas, valores de MIPI e Ki-67 apresentaram significância estatística para SG. Em análise multivariada idade, concentração de albumina e plaquetas apresentaram significância permitindo estabelecer que pacientes com idade superior a 70 anos possuíam risco 8 vezes maior (HR=8,025; valor  $p=0,0101$ ) de ir à óbito em relação aqueles com idade menor ou igual a 70 anos. Para cada

incremento de unidade de albumina houve redução de 79,9% (HR=0,201; valor  $p=0,005$ ) no risco de óbito mantido a idade constante enquanto pacientes com contagem de plaquetas acima de  $146 \times 10^9/l$  tiveram redução de risco de óbito em 78% (HR=0,231; valor  $p=0,003$ ).

**CONCLUSÃO:** Os resultados do presente estudo permitem concluir que a angiogênese não demonstrou ser um valor preditivo de óbito e que parâmetros diferentes dos habitualmente utilizados associam-se a maior risco de óbito. Tais achados devem ser validados em uma coorte mais ampla de pacientes

**Descritores:** Inibidores da Angiogênese. Prognóstico. Linfoma de Célula do Manto. Imuno-Histoquímica

## ABSTRACT

Brasil SAB. [Angiogenesis and prognosis in mantle cell lymphoma]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

**INTRODUCTION:** Mantle Cell Lymphoma (MCL) prognostic factors were defined in a no standardized treatment and less well-known pathogenesis time. Among them, angiogenesis has been little studied. Therefore, angiogenesis impact better definition and new prognostic factors can define higher death-risk groups and help MCL patients' management. **PURPOSE:** To evaluate microvascular density (MDV) in MCL patients treated at the AC Camargo Cancer Center as well as identify demographic, clinical and laboratory factors that impact on overall survival (OS). **MATERIAL AND METHODS:** We conducted a retrospective, single-center and cross-sectional study. We included all non-indolent MCL patients who underwent immuno-chemotherapy. MDV was quantified by CD34 analysis and angiogenesis was determined by HIF- $\alpha$  and VEGF markers. We took into account demographic, clinical, laboratory, prognostic indexes, treatment and response to treatment variables. Cox's proportional hazards model was adjusted to data to describe variables and time until death relationship. Variables selection for multiple Cox regression analysis model was considered from simple Cox model results. **RESULTS:** From 2006 to 2014, we analyzed 63 patients. The majority were male (68.3%) and Ann Arbor stage IV (81%) and they were 64 years old median age with median MIPI= 5.7 and MIPI-b= 6.2. High dose cytarabine was used in 44.4% of patients and 36.5% underwent TACTH. Median follow-up was 72.34 months and median overall OS was 93.91 months. Of 63 patients, 34 had samples for MDV analysis. The mean and median MDV was 14.88 and 3.5 vessels / mm<sup>2</sup>, respectively and 64.71% of patients had VEGF and HIF- $\alpha$   $\geq 10\%$ . In univariate analysis, no angiogenesis parameter showed statistical significance. Age, hemoglobin, albumin, leukocytes, lymphocytes, platelets, MIPI and Ki-67 values were statistically significant for overall survival. In multivariate analysis, age, albumin concentration and platelet count were statistically significant, allowing the establishment of a predictive model. Patients over 70 years old had more than 8 times increased death-risk (HR = 8.025; p = 0.0101) in relation to those with less than or equal to 70 years old. For each albumin unit increment a reduction of 79.9% (HR = 0.201; p-value = 0.005) is expected in death-risk while patients with platelet count above 146 x 10<sup>9</sup>/l had a 78% reduction in death-risk in relation to those with platelet count equal to or

less than this value ( $HR = 0.231$ ;  $p\text{-value} = 0.003$ ). **CONCLUSION:** Angiogenesis has not been shown to have death predictive value. Different parameters from those commonly used are associated with higher death-risk. Such findings should be validated in a broader cohort of patients.

**Keywords:** Angiogenesis   Inhibitors.   Prognosis.   Lymphoma,   Mantle-Cell.  
Immunohistochemistry

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                                       |    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b>  | A superexpressão da proteína ciclinaD1 está no centro da patogênese do LCM.                                                                                                           | 4  |
| <b>Figura 2</b>  | Consequências do dano ao DNA no linfoma de células do manto .....                                                                                                                     | 5  |
| <b>Figura 3</b>  | Modelo histológico, genético e molecular da patogênese de linfoma de células do manto.....                                                                                            | 7  |
| <b>Figura 4</b>  | Histologia do Linfoma de células do manto .....                                                                                                                                       | 8  |
| <b>Figura 5</b>  | Medidas de 5 parâmetros indicativos das alterações que ocorrem com o aumento da distância entre células e microvasos.....                                                             | 16 |
| <b>Figura 6</b>  | Duas fotos de microscopias em imagem de alta resolução da organização detalhada de microvasos em tecido normal x tecido neoplásico .....                                              | 18 |
| <b>Figura 7</b>  | Planilha original de posicionamento dos cortes histológicos de todos os blocos dos pacientes envolvidos no estudo .....                                                               | 27 |
| <b>Figura 8</b>  | Gradícula para estimar o número de microvasos por cada unidade de área. um vaso foi considerado contável na amostra se ocupando a linha divisória entre os quadros da gradícula ..... | 30 |
| <b>Figura 9</b>  | Posicionamento de colocação da gradícula em microscópio ótico para contagem de microvasos.....                                                                                        | 31 |
| <b>Figura 10</b> | Fluxograma dos casos envolvidos no estudo .....                                                                                                                                       | 33 |
| <b>Figura 11</b> | Densidade Microvascular em Linfoma de células do manto por CD34 .....                                                                                                                 | 39 |
| <b>Figura 12</b> | Linfoma de células do manto VEGF e HIF- $\alpha$ .....                                                                                                                                | 40 |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 13</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 .....                                                                                                                    | 42 |
| <b>Figura 14</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com MDV obtido por CD34 em relação à Sobrevida Global.....                                                                                                                                                                                                                         | 43 |
| <b>Figura 15</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com MDV definido por reação imuno-histoquímica a CD34 .....                                                    | 43 |
| <b>Figura 16</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com angiogênese definido por reação imuno-histoquímica a VEGF < 10% (Negativo) ou $\geq 10\%$ (Positivo) ..... | 44 |
| <b>Figura 17</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com angiogênese definido por reação imuno-histoquímica a HIF- $\alpha$ < 10% (Negativo) ou $\geq 10\%$ .....   | 45 |
| <b>Figura 18</b> | Estimativa do ponto de corte para idade ao diagnóstico em relação à sobrevida global .....                                                                                                                                                                                                                                | 46 |
| <b>Figura 19</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com idade $\leq 70$ anos ou > 70 anos .....                                                                    | 46 |
| <b>Figura 20</b> | Estimativa do ponto de corte para concentração de hemoglobina ao diagnóstico em relação à Sobrevida Global .....                                                                                                                                                                                                          | 47 |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 21</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com <i>cut-off</i> de concentração de Hemoglobina $\leq 12\text{g/dl}$ ou $> 12\text{g/dl}$ .....                | 48 |
| <b>Figura 22</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com o número de leucócitos ao diagnóstico em relação à Sobrevida Global .....                                                                                                                                                                                                        | 49 |
| <b>Figura 23</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com <i>cut-off</i> de número de leucócitos $\leq 6,0 \times 10^9/\text{l}$ ou $> 6 \times 10^9/\text{l}$ .....   | 49 |
| <b>Figura 24</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com o número de linfócitos ao diagnóstico em relação à Sobrevida Global .....                                                                                                                                                                                                        | 50 |
| <b>Figura 25</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com <i>cut-off</i> de número de linfócitos $\leq 980 \times 10^6/\text{l}$ ou $> 980 \times 10^6/\text{l}$ ..... | 50 |
| <b>Figura 26</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com o número de monócitos ao diagnóstico em relação à Sobrevida Global .....                                                                                                                                                                                                         | 51 |
| <b>Figura 27</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo <i>cut-off</i> de número de monócitos $\leq 580 \times 10^6/\text{l}$ ou $> 580 \times 10^6/\text{l}$ .....      | 52 |
| <b>Figura 28</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com o número de plaquetas ao diagnóstico em relação à Sobrevida Global .....                                                                                                                                                                                                         | 53 |
| <b>Figura 29</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com <i>cut-off</i> de número de plaquetas $\leq 146 \times 10^6/\text{l}$ ou $> 146 \times 10^6/\text{l}$ .....  | 54 |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 30</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com a concentração de albumina ao diagnóstico em relação à Sobrevida Global .....                                                                                                                                                                                                                                       | 55 |
| <b>Figura 31</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com <i>cut-off</i> de concentração de albumina $\leq 3,8\text{g/l}$ ou $> 3,8\text{g/l}$ .....                                                      | 55 |
| <b>Figura 32</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com a razão entre o valor obtido de DHL e seu respectivo valor máximo da faixa de normalidade ao diagnóstico em relação à Sobrevida Global .....                                                                                                                                                                        | 56 |
| <b>Figura 33</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo <i>cut-off</i> de 1,44 de acordo com a razão entre o valor obtido de DHL e seu respectivo valor máximo da faixa de normalidade ao diagnóstico ..... | 57 |
| <b>Figura 34</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com o valor de MIPI ao diagnóstico em relação à Sobrevida Global .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 58 |
| <b>Figura 35</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo <i>cut-off</i> de MIPI $\leq 6,3$ ou $> 6,3$ .....                                                                                                  | 58 |
| <b>Figura 36</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com o valor de MIPI-b em relação à Sobrevida Global.....                                                                                                                                                                                                                                                                | 59 |
| <b>Figura 37</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo <i>cut-off</i> de 6,8 de MIPI-b $\leq 6,8$ ou MIPI-b $> 6,8$ .....                                                                                  | 59 |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 38</b> | Estimativa do ponto de corte de acordo com o valor de Ki-67 em relação à Sobrevida Global.....                                                                                                                                                                                                                             | 60 |
| <b>Figura 39</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo <i>cut-off</i> de Ki-67 $\leq 40\%$ ou Ki-67 $> 40\%$ .....                                                     | 60 |
| <b>Figura 40</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 34 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo valor obtido de p53 entre 0, $< 10\%$ e $> 50\%$ .....                                                          | 61 |
| <b>Figura 41</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com a base de quimioterapia administrada.....                                                                   | 62 |
| <b>Figura 42</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com o uso ou não de citarabina em alta dose .....                                                               | 62 |
| <b>Figura 43</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com obtenção ou não de Resposta Completa ou Resposta Completa não Confirmada ao tratamento quimioterápico ..... | 63 |
| <b>Figura 44</b> | Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com realização ou não de TACTH.....                                                                             | 64 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                                               |    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b>  | Características que definem o índice prognóstico internacional.....                                           | 10 |
| <b>Tabela 2</b>  | Características que definem o índice prognóstico internacional para linfoma do manto simplificado.....        | 12 |
| <b>Tabela 3</b>  | Dados técnicos referentes aos anticorpos primários usados na reação imunohistoquímica.....                    | 28 |
| <b>Tabela 4</b>  | Dados de positividade e coloração referentes aos anticorpos primários usados na reação imunohistoquímica..... | 29 |
| <b>Tabela 5</b>  | Frequência das variáveis de acordo com idade em anos.....                                                     | 34 |
| <b>Tabela 6</b>  | Frequência das variáveis demográficas e clínicas.....                                                         | 35 |
| <b>Tabela 7</b>  | Frequência das variáveis laboratoriais .....                                                                  | 36 |
| <b>Tabela 8</b>  | Frequência das variáveis de acordo com índices prognósticos.....                                              | 37 |
| <b>Tabela 9</b>  | Frequência das variáveis de acordo com índices prognósticos simplificados .                                   | 37 |
| <b>Tabela 10</b> | Frequência das variáveis de acordo com base de tratamento quimioterápico..                                    | 38 |
| <b>Tabela 11</b> | Frequência das variáveis de acordo com uso de transplante autólogo em primeira remissão .....                 | 38 |
| <b>Tabela 12</b> | Frequências das variáveis de acordo com resposta ao tratamento quimioterápico .....                           | 38 |
| <b>Tabela 13</b> | Frequência das variáveis de acordo com concentração de microdensidade vascular detectado por CD34 .....       | 39 |

|                  |                                                                                                                         |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 14</b> | Frequência das variáveis de acordo com concentração de microdensidade vascular detectado por VEGF e HIF- $\alpha$ ..... | 40 |
| <b>Tabela 15</b> | Estimativas dos parâmetros clínicos de acordo com modelo de regressão de Cox simples .....                              | 65 |
| <b>Tabela 16</b> | Estimativas dos parâmetros laboratoriais de acordo com modelo de regressão de Cox simples .....                         | 66 |
| <b>Tabela 17</b> | Estimativas dos dados de prognóstico de acordo com modelo de regressão de Cox simples .....                             | 67 |
| <b>Tabela 18</b> | Estimativas dos parâmetros de tratamento de acordo com modelo de regressão de Cox simples .....                         | 68 |
| <b>Tabela 19</b> | Estimativas dos parâmetros de angiogênese de acordo com modelo de regressão de Cox simples .....                        | 69 |
| <b>Tabela 20</b> | Estimativas dos parâmetros quantitativos pelo modelo de regressão de Cox múltiplo .....                                 | 70 |
| <b>Tabela 21</b> | Estimativas dos parâmetros qualitativos pelo modelo de regressão de Cox múltiplo .....                                  | 71 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                               |                                                                 |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>ARF</b>                    | “ <i>ADP ribosylation factor</i> ”                              |
| <b>ATM</b>                    | “ <i>Serine/Threonine kinase</i> “                              |
| <b>BCL2</b>                   | “ <i>B cell leukemia/lymphoma 2 protein</i> “                   |
| <b>BCL2L11</b>                | “ <i>BCL2 like 11 protein</i> “                                 |
| <b>BSA</b>                    | Albumina bovina                                                 |
| <b>BTK</b>                    | “Bruton kinase”                                                 |
| <b>CCND1</b>                  | Gene responsável pela síntese da proteína ciclina D1            |
| <b>CDK4/6</b>                 | Quinase 4 e 6 dependentes de ciclina                            |
| <b>CDKN2A</b>                 | Inibidor de ciclina dependente de quinase 2A                    |
| <b>CHK1</b>                   | Gene “ <i>check-point kinase</i> ” tipo 1                       |
| <b>CHK2</b>                   | Gene “ <i>check-point kinase</i> ” tipo 2                       |
| <b>CHOP</b>                   | Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Oncovin + Prednisona           |
| <b>CVP</b>                    | Ciclofosfamida + Vincristina + Prednisona                       |
| <b>DHL</b>                    | Desidrogenase Lática                                            |
| <b>DNA</b>                    | Ácido Desoxirribonucleico                                       |
| <b>DRM</b>                    | Doença residual mínima                                          |
| <b>ECOG</b>                   | “ <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> ”                   |
| <b>FGF-<math>\beta</math></b> | Fator de crescimento de fibroblasto beta                        |
| <b>FLIPI</b>                  | Índice Prognóstico Internacional do Linfoma Folicular           |
| <b>HIF-1</b>                  | Fator induzido por hipóxia -1                                   |
| <b>IGH@</b>                   | Cadeia pesada de imunoglobulina                                 |
| <b>IL-8</b>                   | Interleucina 8                                                  |
| <b>IPI</b>                    | Índice Prognóstico Internacional                                |
| <b>LCM</b>                    | Linfoma de Células do Manto                                     |
| <b>LDGCB</b>                  | Linfoma Difuso de Grandes Células B                             |
| <b>LNH-B</b>                  | Linfoma não Hodgkin de Células B                                |
| <b>LNH-T</b>                  | Linfoma não Hodgkin de células T                                |
| <b>MaxiCHOP</b>               | CHOP com dose intensificada                                     |
| <b>MDM2</b>                   | “ <i>Mouse double minute 2 protein</i> “                        |
| <b>MDV</b>                    | Microdensidade vascular                                         |
| <b>MIPI</b>                   | Índice Prognóstico Internacional do Linfoma de Células do Manto |

|                       |                                                                                                                         |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>MIPI-b</b>         | Índice Prognóstico Internacional do Linfoma de Células do Manto biológico                                               |
| <b>MIPI-s</b>         | Índice Prognóstico Internacional do Linfoma de Células do Manto simplificado                                            |
| <b>NFκ-β</b>          | Fator nuclear Kappa beta                                                                                                |
| <b>OMS</b>            | Organização Mundial da Saúde                                                                                            |
| <b>PAX-5</b>          | <i>“Paired box 5 Protein”</i>                                                                                           |
| <b>PDGFA</b>          | Fator de crescimento derivado de plaquetas A                                                                            |
| <b>R-BAC</b>          | Rituximabe + Bendamustina + Citarabina em dose intermediária                                                            |
| <b>R-CHOP</b>         | Rituximabe + Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Oncovin + Prednisona                                                      |
| <b>R-DHAP</b>         | Rituximabe + Dexametasona + Citarabina em dose alta + Platina                                                           |
| <b>REAL</b>           | <i>“Revised European American Classification for Lymphomas”</i>                                                         |
| <b>R-FC</b>           | Rituximabe + Fludarabina + Ciclofosfamida                                                                               |
| <b>R-HiperCVAD/MA</b> | Rituximabe + Ciclofosfamida + Doxorrubicina + Oncovin + Prednisona + Metotrexato em dose alta + Citarabina em dose alta |
| <b>SG</b>             | Sobrevida Global                                                                                                        |
| <b>SLP</b>            | Sobrevida Livre de Progressão                                                                                           |
| <b>SNC</b>            | Sistema Nervoso Central                                                                                                 |
| <b>SOX-11</b>         | [SRY (sex determination region Y) box 11]                                                                               |
| <b>TACTH</b>          | Transplante de Células Tronco Periféricas Hematopoiéticas                                                               |
| <b>TGF-α</b>          | Fator de crescimento de transformação alfa                                                                              |
| <b>TMA</b>            | Micromatizes teciduais                                                                                                  |
| <b>TP53</b>           | Proteína de tumor 53                                                                                                    |
| <b>Tsp-1</b>          | Trombospondina 1                                                                                                        |
| <b>VEGF</b>           | Fator de crescimento do endotélio vascular                                                                              |
| <b>VSN</b>            | Valor superior de normalidade                                                                                           |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| <b>cm</b>              | Centímetros            |
| <b>g/dl</b>            | Gramas por decilitro   |
| <b>hpf</b>             | Campo de alta potência |
| <b>l</b>               | Litro                  |
| <b>mm</b>              | Milímetros             |
| <b>mm<sup>2</sup></b>  | Milímetro quadrado     |
| <b>mmHg</b>            | Milímetros de Mercúrio |
| <b>NaN<sub>3</sub></b> | Azida Sódica           |
| <b>°C</b>              | Graus Celsius          |
| <b>pO<sub>2</sub></b>  | Pressão de Oxigênio    |
| <b>U/l</b>             | Unidades por litro     |
| <b>μm</b>              | Micrometro             |

# SUMÁRIO

|          |                                                                             |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                      | <b>1</b>  |
| 1.1      | Revisão de Literatura .....                                                 | 1         |
| 1.1.1    | História e Epidemiologia .....                                              | 1         |
| 1.1.2    | Etiologia e Patogênese.....                                                 | 1         |
| 1.1.2.1  | Etiologia.....                                                              | 1         |
| 1.1.2.2  | Patogênese .....                                                            | 2         |
| 1.1.3    | Histologia e Citologia .....                                                | 7         |
| 1.1.4    | Características Clínicas e Fatores Prognósticos .....                       | 9         |
| 1.1.5    | Tratamento.....                                                             | 12        |
| 1.1.6    | Angiogênese em Oncologia .....                                              | 14        |
| 1.1.7    | Angiogênese em Doenças Linfoproliferativas.....                             | 19        |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA .....</b>                                                  | <b>21</b> |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                      | <b>22</b> |
| 3.1      | Objetivo Geral .....                                                        | 22        |
| 3.2      | Objetivos Específicos .....                                                 | 22        |
| <b>4</b> | <b>MÉTODOS.....</b>                                                         | <b>23</b> |
| 4.1      | Desenho de Estudo .....                                                     | 23        |
| 4.2      | Estratégia de Busca de Pacientes.....                                       | 23        |
| 4.3      | Análise Patológica .....                                                    | 25        |
| 4.3.1    | Revisão Histopatológica .....                                               | 25        |
| 4.3.2    | Procedimentos para a construção do arranjo das micromatizes teciduais ..... | 26        |
| 4.3.3    | Procedimentos para a realização da técnica de imunohistoquímica.....        | 27        |
| 4.3.4    | Procedimentos para a contagem de microvasos .....                           | 30        |
| 4.4      | Análise Estatística.....                                                    | 31        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                                                     | <b>33</b> |
| 5.1      | Análise Descritiva.....                                                     | 33        |

|          |                                                                                           |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2      | Análise de Sobrevida Global.....                                                          | 40        |
| 5.2.1    | Análise de Sobrevida Global de acordo com variáveis de dados clínicos e demográficos..... | 42        |
| 5.2.2    | Análise de Sobrevida Global de acordo com variáveis de dados laboratoriais .....          | 45        |
| 5.2.3    | Análise de Sobrevida Global de acordo com variáveis de índices prognósticos.....          | 47        |
| 5.2.4    | Análise de Sobrevida Global de acordo com variáveis de tratamento .....                   | 57        |
| 5.2.5    | Análise de Sobrevida Global de acordo com variáveis de angiogênese.....                   | 61        |
| 5.3      | Modelo de Regressão de Cox Simples .....                                                  | 63        |
| 5.4      | Modelo de Riscos Proporcionais de Cox Múltiplo.....                                       | 69        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                    | <b>72</b> |
| 6.1      | Aspectos Gerais .....                                                                     | 72        |
| 6.2      | Aspectos Demográficos e Clínicos.....                                                     | 73        |
| 6.3      | Aspectos Laboratoriais .....                                                              | 74        |
| 6.4      | Aspectos Relacionados a Índices Prognósticos e Tratamento .....                           | 75        |
| 6.5      | Aspectos Relacionados a Angiogênese .....                                                 | 77        |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                                    | <b>79</b> |
| <b>8</b> | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                   | <b>80</b> |

## ANEXOS

**Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

**Anexo 2** Estadiamento Ann Arbor

**Anexo 3** ECOG

**Anexo 4** Critérios de Resposta:

1999 - Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B., et al. JCO 1999;17:1244-1253

2007 - Cheson B.D., Pfistner B., Juweid M.E., et al. JCO 2007;25(5) 579-586

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.1 História e Epidemiologia

Historicamente, a primeira descrição de uma entidade semelhante ao Linfoma de Células do Manto foi realizada por Rappaport et al. em 1956 <sup>1</sup>. Posteriormente, pela Classificação Kiel, o Linfoma de Células do Manto pode ser comparado ao que então foi denominado Linfoma Centrocítico <sup>2</sup>. Em 1992 foi aceito pela classificação REAL (*“Revised European American Classification for Lymphoma”*) e em 2001 pela classificação da OMS (Organização Mundial da Saúde) como um subtipo de Linfoma não Hodgkin de células B (LNH-B). Desde então passou a ser denominado de Linfoma de Células do Manto <sup>2,3,4</sup>.

O Linfoma de Células do Manto (LCM) corresponde de 3 a 10% de todos os Linfomas não Hodgkin. Tem incidência anual de 0,51-0,55/100.000 pessoas, de acordo com os dados do registro nacional dos Estados Unidos no período de 1990 a 2000. Dados semelhantes são observados na população da Europa no início do século XXI que mostra uma incidência aproximada de 0,45/100.000 pessoas ao ano <sup>3-8</sup>. É uma neoplasia tipicamente de indivíduos com idade superior a 60 anos e preferencialmente do sexo masculino. Dados norte americanos e europeus demonstram uma prevalência de 2,3 a 2,5 homens para cada mulher acometida, com uma mediana de idade ao diagnóstico de 60 a 65 anos <sup>3-8</sup>. Nos Estados Unidos, entre os anos de 1992 a 2004, a média de idade ao diagnóstico no sexo masculino era de 67 anos e de 70 anos no sexo feminino <sup>7-8</sup>.

### 1.1.2 Etiologia e Patogênese

#### 1.1.2.1 Etiologia

Agentes infecciosos ou inflamatórios, doenças associadas, exposição ambiental à radiação, toxinas, medicamentos, álcool ou drogas não apresentam ter clara relação com a patogênese do LCM. Entretanto, indivíduos com história familiar de neoplasia hematológica apresentam risco duas vezes maior de desenvolver LCM se comparado com a população em geral. Essa relação familiar parece estar associada a suscetibilidade genética para o desenvolvimento de linfoma nos indivíduos de uma mesma família ou a exposição ambiental desses indivíduos a fatores ainda pouco estudados <sup>4</sup>.

### 1.1.2.2 Patogênese

A patogênese do LCM é marcada por diversas alterações genéticas. São observados ganhos, perdas e amplificações de regiões cromossômicas que contêm genes envolvidos tanto na regulação do ciclo celular como nas vias de reparo do DNA e apoptose celular <sup>9</sup>.

A alteração genética primária é a translocação entre o gene responsável pela síntese da cadeia pesada da imunoglobulina (IGH@) localizado no cromossoma 14 e o gene responsável pela síntese da proteína da ciclinaD1 (CCND1), localizado no cromossoma 11. Esta proteína é responsável pela transição natural da fase G1 do ciclo celular para a fase S. Deste modo, a t (11;14) (q13; q32) resulta em superexpressão da proteína ciclinaD1 o que acelera o ciclo celular e promove proliferação celular descontrolada <sup>9,10</sup>.

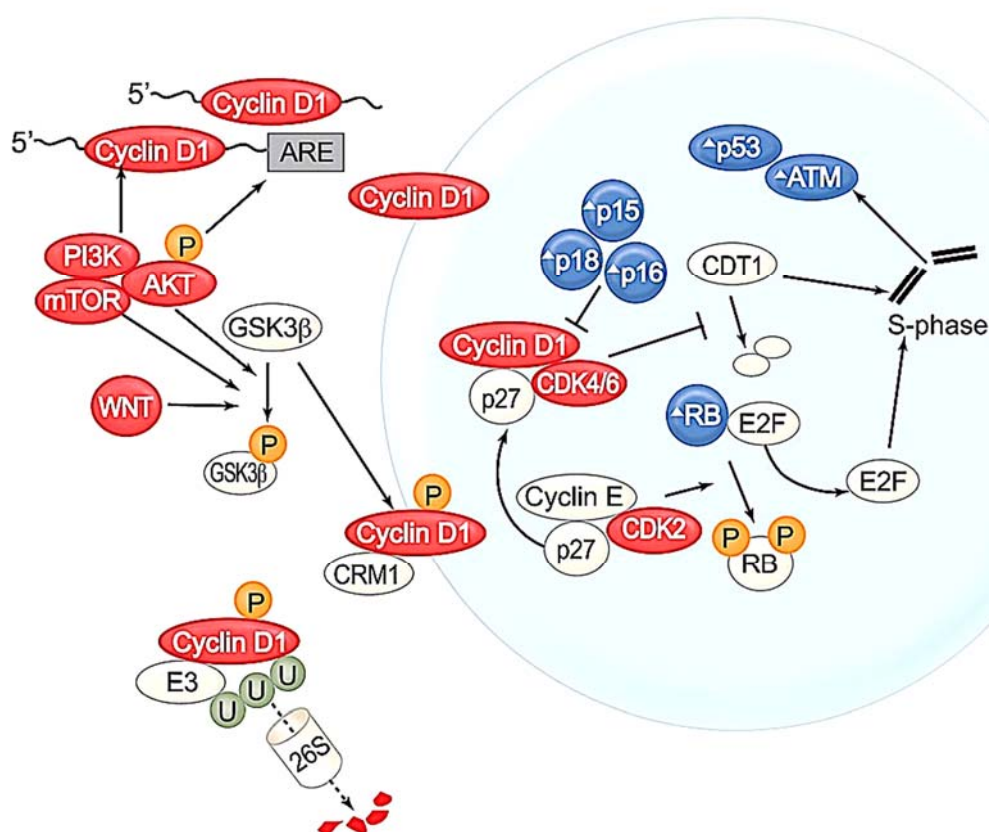
No processo natural de mitose, para exercer sua ação a ciclinaD1 se une às proteínas CDK4/6 (Quinases 4 e 6 dependentes de ciclina) na fase G1. Normalmente, o complexo formado ciclinaD1-CDK4/6 tem sua concentração progressivamente aumentada até que ultrapasse os efeitos inibitórios de inúmeras proteínas e cofatores intracelulares. É desta maneira que há a passagem da fase G1 para a fase S, tem início a síntese de DNA e desenvolve-se o ciclo celular. No entanto, por vezes, há necessidade deste ciclo ser pausado. Dentre as proteínas e cofatores inibitórios intracelulares estão os produzidos pelo gene supressor tumoral CDKN2A: p16, p23 e p27. Estas proteínas possuem o papel de se ligar ao complexo CCND1-CDK4/6 e inativá-lo para que a célula não inicie processo de divisão <sup>10,11</sup>. Por conseguinte, é o balanço entre as concentrações intracelulares de fatores estimuladores: complexo CCND1-CDK4/6 - e inibidores: p16, p23 e p27 - que mantém a proliferação celular adequada e equilibrada.

Todavia, uma vez que ocorre t (11;14) (q13; q32) e consequente superexpressão da proteína ciclinaD1, os efeitos inibitórios produzidos pelas proteínas p16, p23 e p27 são suplantados. Esta situação gera um desequilíbrio que resulta no estímulo anormal à passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular com consequente aumento da proliferação celular <sup>11</sup>. Somam-se a isto as deleções observadas em *locus* do gene CDKN2A resultando em redução da transcrição destas mesmas proteínas p16, p23 e p27 e maior perda de controle regulatório sobre o complexo CCND1-CDK4/6 o que aumenta ainda mais o descontrole da proliferação celular <sup>10</sup>. Além disso, pode ocorrer ainda a deleção do gene CDKN2A o que também determina efeitos sobre importantes supressores tumorais, tais como a via ARF/MDM2/TP53 <sup>12</sup>.

O gene TP53 que é um dos mais conhecidos “freios moleculares” e atua através de seu fator de transcrição: p53. Normalmente, este gene encontra-se inativo no núcleo da célula unido ao gene MDM2 formando o complexo estável MDM2/TP53. No entanto, na presença de dano

ao material genético, enzimas separam o gene MDM2 do gene TP53 aumentando sua concentração o que estimula as vias inibidoras das CDK e determina parada do ciclo em G1 para reparo do DNA. Caso esse reparo por alguma razão não ocorra o gene TP53, através de seu fator de transcrição, p53, induzirá apoptose da célula alterada <sup>13</sup>. Contudo, para que este mecanismo ocorra é necessário que p53 permaneça estável e ativo. Para tanto, o p53 liga-se ao ARF e essa ligação estabiliza p53 impedindo sua degradação. Todavia, a deleção do CDKN2A, observada principalmente nas variantes mais agressivas do LCM, determina redução do ARF com consequente instabilidade do p53 facilitando sua degradação, reduzindo sua meia-vida e diminuindo seus efeitos antineoplásicos <sup>12,13,14</sup>. Além disso, mutações com inativação direta do gene TP53 e, alternativamente, inativação do p53 por deleção dos genes ARF ou amplificação do MDM2<sup>12</sup> também são descritas (Figura 1)

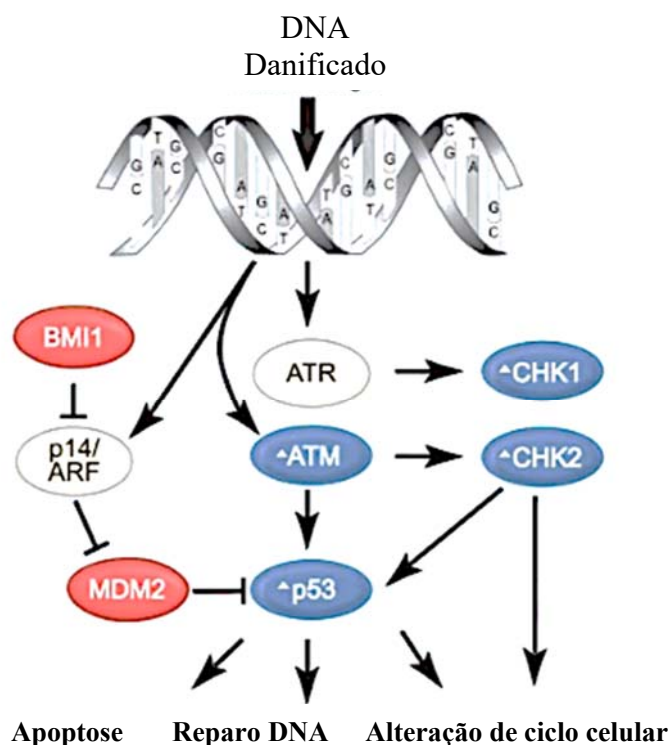
Outros genes que têm como alvo final a proteína p53 merecem destaque no processo de transformação neoplásica do LCM. Entre eles estão o gene ATM que sofre deleções e mutações. O gene ATM é importante regulador de instabilidade cromossômica, assim como os genes CHK1 e CHK2 (*“Checkpoint kinase”* 1 e 2). Em condições normais estes genes são ativados quando ocorrem danos ao DNA. Eles codificam quinases que atuam sobre a proteína p53 e a fosfatase CDC25 determinando parada do ciclo celular em G1/S e G2/M graças a bloqueio da síntese de DNA e da mitose nas células comprometidas <sup>12,15</sup>. No entanto, com a proteína p53 inativada este mecanismo, que possibilitaria correção de danos ao DNA, torna-se deficiente (Figura1).



**Fonte:** Modificado de Pérez-Galán et al. <sup>25</sup>

**Figura 1** – A superexpressão da proteína ciclinaD1 está no centro da patogênese do LCM. Uma vez que ocorre t (11;14) (q13; q32) e superexpressão da proteína CiclinaD1, esta vai ao núcleo, combina-se com CDK4/6 vencendo os efeitos inibitórios produzidos pelas proteínas p16, p23 e p27e o complexo promove passagem de fase G1 para fase S. Somam-se as deleções no *locus* do gene CDKN2A com redução da transcrição das proteínas p16, p23 e p27 o que aumenta ainda mais o descontrole da proliferação celular <sup>10</sup>. Além disso, pode ocorrer ainda a deleção do gene CDKN2A o que também determina efeitos sobre importantes supressores tumorais, tais como a via ARF/MDM2/TP53. Outros genes que têm como alvo final a proteína p53 - entre eles estão o gene ATM e os genes CHK1 e 2 sofrem mutações e inibem a reparação ao DNA danificado. Assim, vários componentes da maquinaria do controle do ciclo celular alteram-se no LCM. Em azul estão moléculas inativadas ou com ação reduzida; Em Vermelho estão moléculas ativadas ou superexpressas

Além de alterações na proliferação celular e no reparo do DNA, mecanismos de sinalização celular e apoptose também se encontram alterados no LCM. Neste contexto, têm sido descritos o aumento na expressão do fator antiapoptótico BCL-2 e a deleção do gene pró-apoptótico BCL2L11 culminando no aumento da sobrevivência da célula neoplásica <sup>12</sup>. Além disso, também é descrito inativação de reguladores da via NF- $\kappa$ B que exerce importante papel na proliferação, diferenciação e manutenção do linfócito B <sup>12,16</sup> (Figura 2).



**Fonte:** Modificado de Pérez-Galán et al. <sup>25</sup>

## **Figura 2 - Consequências do dano ao DNA no Linfoma de Células do Manto**

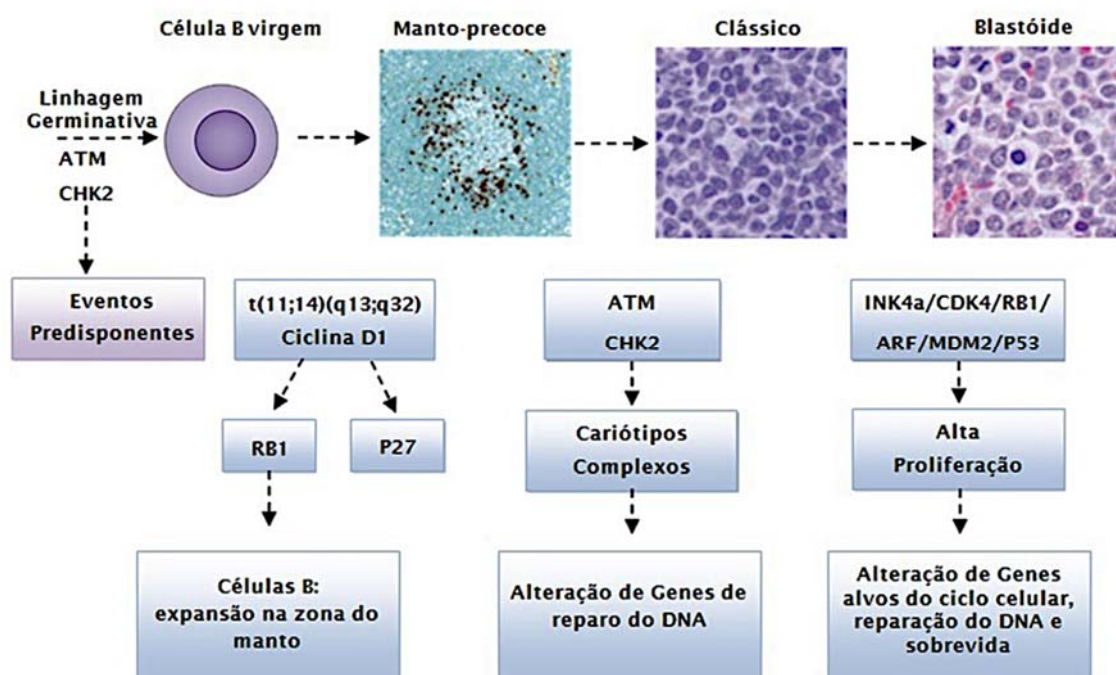
Uma vez ocorrendo dano ao DNA, o complexo TP53/MDM2 e ARF é ativado e a progressão do ciclo celular é inibido para reparo ao DNA ou apoptose. MDM2, que tem como alvo p53 é degradado por ARF que também leva a parada do ciclo celular. No LCM várias destas etapas estão alteradas de modo que o reparo ao DNA não ocorre e o ciclo celular continua. Em vermelho: moléculas inibidas ou inativas. Em azul: moléculas estimuladas ou superexpressas.

Todavia, apesar de ser considerado o marco genético na patogênese do LCM, a superexpressão da proteína ciclinaD1 pode não estar presente em todos os casos. Pacientes com diagnóstico de linfoma que apresentam características morfológicas, imunofenóticas e genéticas semelhantes ao LCM, porém sem expressão de ciclinaD1, foram descritos <sup>17</sup>. Análises genéticas demonstraram que essas variantes podem corresponder em até 10% dos casos e possuem translocações cromossômicas dos genes que codificam as ciclinasD2 e D3 com os genes das cadeias pesada e leve das imunoglobulinas. Como consequência, ocorre superexpressão das proteínas ciclinasD2 e D3 que assumem os efeitos oncogênicos antes relacionados apenas à ciclinaD1 <sup>17,18,19</sup>. Esses achados tornam o diagnóstico e a caracterização do LCM restrito não apenas à expressão aumentada de ciclinaD1.

Nesse contexto têm sido descritos outros importantes marcadores biológicos no processo de oncogênese e progressão tumoral. Dentre eles destaca-se o SOX-11. O fator de transcrição SOX-11 está presente em 90-95% dos casos de LCM independente da positividade

da ciclinaD1<sup>20,21</sup>. Seus efeitos na patogênese do LCM estão ligados aos mecanismos de proliferação celular, diferenciação dos linfócitos B, apoptose e angiogênese<sup>21</sup>. Um dos alvos mais importantes do SOX-11 na ontogenia linfocitária é o PAX-5, um fator regulador da diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos maduros. Contudo, o estímulo à expressão de PAX-5 torna o linfócito pouco responsivo aos sinais de diferenciação o que bloqueia seu processo de maturação e culmina na formação de células neoplásicas<sup>22,23</sup>. Além disso, o SOX-11 também se relaciona a efeitos pró-angiogênicos. A angiogênese que ocorre nesse cenário deve-se ao estímulo da secreção de fatores solúveis, principalmente o PDGFA (“*platelet derived growth factor A*”), que resulta na proliferação de células endoteliais, migração de células para os sítios envolvidos e neoformação de vasos determinando aumento da microdensidade vascular (MDV) local. O aumento desregulado do suprimento sanguíneo promove crescimento tumoral e progressão da doença<sup>22,24</sup>.

Deste modo, esse conjunto complexo de alterações genéticas, fatores de transcrição e biomarcadores celulares que estimulam a proliferação celular, impedem a reparação de DNA, inibem a apoptose celular e aumentam a angiogênese do microambiente tumoral determinarão a evolução citológica, histológica e apresentação clínica e biológica do LCM (Figura 3).



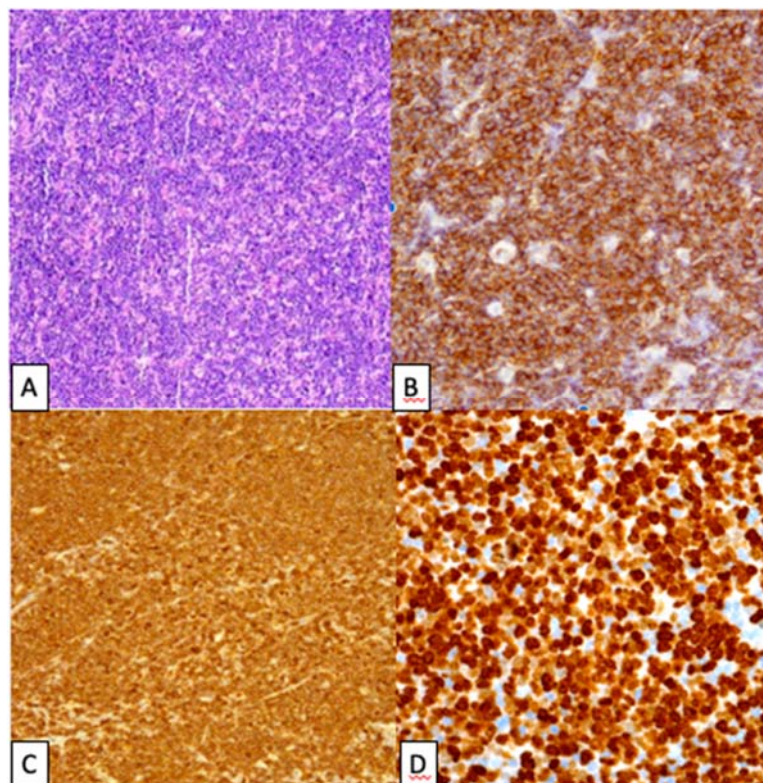
Fonte: Modificado de Jates et al.<sup>26</sup>

**Figura 3** - Modelo histológico, genético e molecular da patogênese de Linfoma de Células do Manto.

### 1.1.3 Histologia e Citologia

O LCM é definido como uma das neoplasias de células B maduras periféricas. É caracterizada pela proliferação monomórfica de linfócitos de tamanho pequeno a médio que apresentam contorno nuclear irregular e nucléolos inconspícuos. Essas células neoplásicas circundam os centros germinativos reativos dos folículos linfóides e passam a proliferar, substituindo a zona do manto do tecido linfóide normal por um tecido com aspecto vagamente nodular ou difuso ou, mais raramente, folicular. Assim, são reconhecidas quatro variantes histológicas do LCM: a variante “pequenas células”, a variante “tipo-zona marginal” e as formas mais agressivas - variantes blastóide e pleomórfica. Essas duas últimas associadas a um pior prognóstico<sup>1</sup>.

Por se tratar de neoplasia linfóide de células B, a imunofenotipagem e a imuno-histoquímica demonstram positividade para os antígenos CD19, CD20 e CD22, mas mostra-se, em geral, negativa para CD23. O antígeno CD5 também se mostra positivo apesar de ser marcador de linfócitos de linhagem T (Figura 4).



**Figura 4** – Histologia do Linfoma de células do manto. A neoplasia costuma apresentar um padrão difuso de crescimento – Hematoxilina – eosina (A). O **imunofenótipo** clássico é demonstrado pela expressão CD20 (B); CD5 (C) e CiclinaD1(D). Foto cedida pelo Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center

Além disso, na maioria das vezes essas células apresentam expressão de marcadores encontrados em células B “naive”, tais como IgM/IgD de superfície, ausência de hipermutação somática do gene da cadeia pesada da imunoglobulina (IGVH) e ausência de expressão de marcadores de linfócitos originários no centro germinativo como antígenos CD10 e BCL6<sup>1,25</sup>. Essas observações definem que, na maioria das vezes, a células do LCM deriva de linfócitos B cuja origem é anterior a passagem pelo centro germinativo<sup>25</sup>. Contudo, em número menor de casos as células mostram hipermutação somática do gene da IGVH, demonstrando serem células B que já passaram pelo centro germinativo<sup>25</sup>. Esses dados propõem a presença de duas formas de apresentação biológica que levará a diferentes repercussões clínicas<sup>25,26</sup>.

Assim, a forma de apresentação clássica, mais comum, presente em cerca de 80% dos casos e denominada LCM clássica, corresponde às células B maduras que não tiveram contato com o centro germinativo do folículo linfoide e carregam pouca ou nenhuma mutação somática do gene da cadeia pesada da imunoglobulina (IGHV)<sup>23</sup>. Essas células tendem a expressar SOX-11 e ser geneticamente mais instáveis pois acumulam alterações em genes reguladores do ciclo celular, de vias de reparo do DNA e de mecanismos de sobrevivência celular. Clinicamente assumem um comportamento clínico mais agressivo<sup>23</sup>.

A outra forma de apresentação do LCM, presente em cerca de 20% dos casos, é caracterizada por células que já tiveram contato com o centro germinativo e, por isso, apresentam hipermutação somática do gene IGHV. Geneticamente demonstram maior estabilidade e baixa positividade ou negatividade para expressão de SOX-11<sup>23</sup>. Clinicamente, estes pacientes possuem uma tendência à apresentação leucêmica, comprometimento esplênico mais frequente que nodal e evolução mais lenta. Estes casos são denominados LCM indolente<sup>22</sup>. Entretanto, com o tempo, alterações em genes como o TP53 podem ocorrer tornando-a mais agressiva<sup>23,24</sup>.

Fenótipos aberrantes como expressão negativa para CD5, ou expressões positivas para CD10 e/ou BCL6, ou até mais de uma alteração presente, podem ser encontrados mais comumente nas variantes blastoide e pleomórfica causando dificuldade no diagnóstico principalmente se as características morfológicas não forem clássicas e o tamanho da biópsia for pequeno<sup>25,28</sup>. No entanto, o significado clínico dos imunofenótipos variantes e a relação destes sobre o comportamento biológico ainda é incerto<sup>28,29</sup>. Desta forma, a maior relevância ainda reside no diagnóstico diferencial com outros tipos de linfoma de células B, tais como Linfoma Folicular, Leucemia Linfocítica Crônica/ Linfoma de Pequenos Linfócitos ou ainda Linfoma da Esplênico da Zona Marginal<sup>25</sup>.

Por conseguinte, torna-se importante reconhecer tanto a variabilidade do fenótipo do LCM para definição diagnóstica como as variantes clássica ou indolente para apresentação clínica. Estes dados são fundamentais para melhor condução terapêutica e conhecimento de fatores prognósticos.

#### **1.1.4 Características Clínicas e Fatores Prognósticos**

Clinicamente, os portadores do LCM clássico, isto é, não indolente, apresentam-se com linfonodomegalia generalizada e, em aproximadamente 70% dos casos, em estágio avançado ao diagnóstico<sup>30</sup>. O comprometimento extranodal está presente em cerca de 90% dos casos sendo a medula óssea e o trato gastrointestinal os principais locais acometidos, seguidos do baço e fígado<sup>1,30,31</sup>. Na forma clássica a detecção de disseminação em sangue periférico pode ser observada de modo mais frequente a depender do método diagnóstico utilizado<sup>1,26</sup> porém, a apresentação leucêmica evidente ocorre em 20% a 30% dos casos e estes pacientes tendem a apresentar um comportamento clínico mais agressivo com prognóstico reservado quando associado a forma blastoide<sup>1,31</sup>. Também associados a variante blastoide estão o comprometimento cutâneo<sup>31</sup> e do sistema nervoso central (SNC) que ocorre em cerca de 4% a 25% dos pacientes e que confere sobrevida mediana de apenas 3,7 meses após o

diagnóstico<sup>32,33</sup>. Além do quadro clínico caracterizado por estágio avançado e frequente comprometimento extranodal, a maioria dos pacientes com LCM clássico também apresenta recidivas frequentes, refratariedade precoce à quimioterapia e sobrevida sem tratamento inferior a 6 meses.

Em oposição a esta agressividade, em aproximadamente 10-20% dos casos, os pacientes que apresentam a forma indolente do LCM podem permanecer assintomáticos por longo tempo e ter sobrevida mediana maior que 10 anos sem qualquer intervenção terapêutica em alguns casos<sup>20,34</sup>. Esse subgrupo de pacientes se caracteriza por comprometimento frequente da medula óssea, tendência à leucemização com leucocitose moderada, valores menores de desidrogenase lática (DHL), melhor “*performance status*” menor taxa de proliferação celular além de biologicamente demonstrarem expressão de ciclinaD1, mas ausência de expressão de SOX-11<sup>35</sup>.

Uma vez que se observou heterogeneidade no comportamento clínico do LCM, a busca por definir fatores prognósticos que expressassem a evolução da doença e auxiliassem na escolha da melhor conduta terapêutica sempre esteve presente.

O primeiro índice utilizado na estratificação de risco dos pacientes com LCM foi o IPI (“*International Prognostic Index*”) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Características que definem o índice Prognóstico Internacional

| Características pré-tratamento        | Fatores de Bom Prognóstico  | Fatores de Mau Prognóstico  |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Idade                                 | ≤ 60 anos                   | > 60 anos                   |
| Estádio Ann Arbor                     | Doença localizada (I ou II) | Doença avançada (III ou IV) |
| Número de áreas extranodais           | ≤ 1                         | > 1                         |
| “ <i>Performance status</i> ” (ECOG)* | ≤ 1                         | > 1                         |
| DHL sérica                            | Normal                      | Elevada                     |

ECOG: índice de “*performance status*” criado pela “*Eastern Cooperative Oncology Group*” (ver em Anexos 4)

Entretanto, desenvolvido inicialmente para pacientes com linfomas agressivos, sobretudo portadores de Linfoma Difuso de Grandes Células B<sup>36</sup>, o IPI mostrou baixa sensibilidade para os linfomas de comportamento indolente e limitações na avaliação de prognóstico dos pacientes com LCM o que demonstrou a necessidade da criação de um índice mais específico para esse linfoma<sup>37,38</sup>. Nesse sentido, foram reunidos dados de 455 pacientes com diagnóstico de LCM com doença avançada (Ann Arbor III a IV) no período de maio de 1996 a outubro de 2004 e avaliados parâmetros associados à sobrevida aplicando o IPI e o

FLIPI (“*Follicular Lymphoma International Prognostic Index*”). Deste processo, resultou na criação do MIPI (“*Mantle Cell International Prognostic Index*”) - índice prognóstico específico para os pacientes com LCM. O MIPI tem como fatores prognósticos independentes: idade, “*performance status*” do paciente de acordo com ECOG (“*Eastern Cooperative Oncology Group*”), número de leucócitos e concentração sérica de desidrogenase láctica (DHL) ao diagnóstico<sup>38</sup>. O cálculo de MIPI é feito de acordo com a seguinte fórmula:

$$[0.03535 \times \text{idade (anos)}] + 0.6978 \text{ (se ECOG} > 1) + [1.367 \times \log_{10}(\text{DHL/VSN}^*)] + [0.9393 \times \log_{10}(\text{leucócitos}/\mu\text{L sangue})]$$

\* VSN= Valor superior da faixa de normalidade para concentração de DHL

Com estes dados reunidos o MIPI mostrou ser capaz de estratificar os riscos de recidiva e morte possibilitando padronização e melhor comparação do prognóstico destes pacientes<sup>38,39</sup>. De acordo com esse escore, os pacientes são classificados em 3 grupos: alto risco (valor > 6,2), risco intermediário (valor entre 5,7 e 6,2) e baixo risco (valor < 5,7) com sobrevida global média de 1,4 anos; 3,8 anos e 6,3 anos respectivamente para cada subgrupo<sup>38,39,40</sup>. Devido a complexidade de seu cálculo, um escore simplificado foi desenvolvido: o MIPI simplificado (MIPIs). O MIPIs também divide os pacientes em 3 grupos de acordo com um sistema de pontuação: baixo risco (score 0-3), risco intermediário (4 ou 5), alto risco (6-11) resguardando boa correlação com o MIPI e com as curvas de sobrevida validadas junto ao escore original (Tabela 2)<sup>39,39,40</sup>.

Paralelamente, a avaliação da atividade de proliferação celular medida indiretamente através do índice mitótico ou, mais frequentemente, do marcador imuno-histoquímico Ki-67, passou a representar um elemento independente no prognóstico destes pacientes<sup>41,42</sup>. A incorporação do Ki-67 ao MIPI resultou no MIPI biológico (MIPI-b) que despontou como o melhor escore preditor de sobrevida dos pacientes ao diagnóstico<sup>37</sup>. De acordo com estes índices a maioria dos pacientes apresenta prognóstico desfavorável, com sobrevida média em torno de 3-5 anos<sup>31</sup>. No entanto, nem o uso de MIPI ou MIPI-b e seus correlatos simplificados auxiliam na definição da melhor escolha de tratamento.

**Tabela 2** - Características que definem o índice Prognóstico Internacional para Linfoma do Manto simplificado

| Idade(anos) | Performance Status (ECOG) | DHL/Valor Superior da Normalidade | Número de Leucócitos (10 <sup>9</sup> /l) | Pontos |
|-------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|--------|
| < 50        | 0-1                       | < 0,67                            | < 6,7                                     | 0      |
| 51 a 59     |                           | 0,68-0,99                         | 6,7 – 9,9                                 | 1      |
| 60-69       | 2-4                       | 1,00-1,49                         | 10,0 – 14,9                               | 2      |
| ≥ 70        |                           | ≥ 1,50                            | ≥ 15,0                                    | 3      |

Mais recentemente, ressalta-se a importância da pesquisa de doença residual mínima (DRM). Contudo, a DRM só pode ser utilizada após o início do tratamento e, por conseguinte, também não auxilia na sua definição. Além disso, não apresenta aplicação rotineira na prática clínica e não mostra padronização quanto ao seu método<sup>43</sup>. Deste modo, a tendência atual é utilizar a DRM apenas em pesquisas clínicas e, futuramente, para ajuste de dose de quimioterapia e possível associação de quimioterápicos<sup>23,43</sup>.

Deste modo, há premente necessidade de novos parâmetros e fatores de risco para o prognóstico dos pacientes com LCM uma vez que os mais frequentemente utilizados originaram-se há cerca de 20 anos quando as opções de tratamento eram diferentes das atualmente utilizadas as quais se caracterizam por serem mais agressivas e/ou com alvos moleculares mais específicos<sup>31,34</sup>.

### 1.1.5 Tratamento

A escolha da melhor estratégia terapêutica baseia-se, atualmente, no estadiamento da doença, na avaliação da idade do paciente, em sua “performance status” e em suas comorbidades.

Com relação ao estadiamento, apenas 10-20% dos pacientes possuem comprometimento de apenas 1 a 3 cadeias linfonodais vizinhas ao diagnóstico e são então considerados como portadores de doença localizada. Nestes casos a radioterapia tem papel destacado<sup>31,44</sup> com uso da técnica de campo envolvido como agente isolado ou em associação a quimioterapia cujas respostas tornou-a opção de tratamento para pacientes com doença localizada<sup>45,46,47</sup>.

Por outro lado, 80 a 90% dos pacientes apresentam doença disseminada ao diagnóstico e os estudos têm dado ênfase à escolha da melhor terapia de primeira linha para aumento da sobrevida global (SG) destes pacientes. Para tanto, há 3 elementos que se mostraram eficientes: uso de anticorpo monoclonal anti-CD20; uso de citarabina em dose igual ou superior a 1g/m<sup>2</sup> e

a utilização da infusão de células-tronco hematopoiéticas após quimioterapia em altas doses (TACTH) posterior a 1ª remissão<sup>47</sup>. Todavia, como o uso do TACTH é dependente de “*performance status*” e da idade do paciente, deve-se levar em conta 2 situações para definir o melhor tratamento para doença disseminada: pacientes elegíveis a TACTH e pacientes não elegíveis a TACTH.

A incorporação do TACTH deveu-se a avaliação de pacientes elegíveis que responderam ao esquema CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona) e irradiação corporal total seguido de comparação entre TACTH ou uso de alfa-interferon. O grupo do TACTH apresentou aumento da sobrevida livre de progressão e aumento de sobrevida livre de progressão (SLP) quando comparado ao segundo (SLP 39 versus 19 meses,  $P=0,011$ )<sup>48,49</sup>. Estudos subsequentes mostraram que a incorporação de citarabina em dose igual ou superior a  $1\text{g/m}^2$  e rituximabe ao esquema de indução antes do TACTH, proporcionava aumento da taxa de resposta completa e tempo livre de progressão<sup>50,51,52</sup>. O Grupo Europeu de LCM (*European MCL Network*) em um estudo fase III confirmou que a indução com 3 ciclos de R-CHOP (rituximabe associado a ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona) alternado com 3 ciclos de R-DHAP (rituximabe associado a dexametasona, citarabina em dose elevada e cisplatina) seguido por dose elevada de citarabina e TACTH apresentou incremento no tempo para o próximo tratamento (88 meses versus 46 meses,  $p=0,038$ ) e sobrevida global (83 meses,  $p=0,045$ ) em comparação com a indução apenas com R-CHOP seguido de consolidação com TACTH e com número semelhante de mortes relacionadas ao tratamento<sup>53</sup>. Um esquema semelhante – Esquema Nórdico MCL2 - que alternou R-CHOP com dose intensificada (Maxi-CHOP) com citarabina em dose elevada associada ao rituximabe seguido de TACTH mostrou maior tempo de remissão com benefícios principalmente para subgrupos MIPI de risco baixo e intermediário<sup>54,55</sup>. Além disso, mostrou -se que o impacto do uso de citarabina no tempo para o próximo tratamento estaria relacionado à qualidade da remissão molecular que apresentou aumento de 32 para 73% após a indução<sup>56</sup>. Assim, para o paciente com idade inferior a 65 anos e com boa “*performance status*” o tratamento atual de escolha envolve esquemas quimioterápicos com citarabina em altas doses e rituximabe seguido de consolidação com TACTH ainda em primeira remissão.

Para os pacientes não elegíveis a TACTH mas com boas condições clínicas, o uso de rituximabe associado a ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona (R-CHOP); ou a fludarabina e ciclofosfamida (R-FC); a bendamustina (R-Benda) ou ainda a bendamustina e citarabina em dose intermediária ( $500\text{mg/m}^2$ ) (R-BAC) são opções para terapia inicial<sup>52,57-61</sup>.

Por fim, para o subgrupo de pacientes não candidatos a TACTH e considerados clinicamente frágeis, portadores de comorbidades ou condição clínica proibitiva para quimioterapias mais intensivas, são utilizados esquemas alternativos com rituximabe isolado ; rituximabe associado a ciclofosfamida, vincristina e prednisolona (R-CVP); ou ainda uso isolado de clorambucil, cladribina ou talidomida<sup>62,63</sup>.

Se há pouco consenso nos casos de primeira linha, para os casos de recidiva não há qualquer terapia padronizada. No entanto, sabe-se que a qualidade e a duração da remissão serão inferiores àquelas apresentadas após terapia inicial e assim, para pacientes mais jovens, geralmente utiliza-se imunoquimioterapia para reindução de remissão seguida de consolidação com transplante alogênico<sup>64</sup>.

A dificuldade para outras opções de tratamento somado a agressividade do LCM demonstrado nos baixos índices de sobrevida global e altos índices de mortalidade, estimularam o surgimento de estudos para uso de novas drogas no intuito de compor esquemas quimioterápicos mais eficazes com melhores taxas de resposta e maior tempo de duração da remissão. Nesse sentido, há grande variedade de agentes que assumiram algum papel no tratamento do LCM refletindo a complexidade das alterações genéticas envolvidas. Assim, diversas enzimas de sinalização molecular que fazem parte da via NF- $\kappa$ B tais como PI3K-AKT, mTOR e da BTK despontaram recentemente como importantes alvos terapêuticos<sup>23</sup>. Estudos feitos em grupos de pacientes recidivados/refratários resultaram na liberação de novas drogas para uso em LCM nos EUA: bortezomibe<sup>65,66</sup> (Velcade®), temsirolimo<sup>67</sup> (Torisel®), lenalidomida<sup>68</sup> (Revlimid®) e ibrutinibe<sup>69</sup> (Imbruvica®).

Destas medicações, a lenalidomida atua não apenas sobre a célula neoplásica, mas também sobre o microambiente tumoral. Através de efeitos imunomoduladores, a lenalidomida atua dificultando a interação entre as células neoplásicas e o estroma tecidual além de também inibir a angiogênese. Deste modo, atuando de modo isolado, a lenalidomida é o exemplo de que a interferência na viabilidade microambiente tumoral passa a ter cada vez mais importância como opção futura para tratamento de neoplasias linfoides. Para tanto, o entendimento da capacidade de geração de vasos - angiogênese - para a viabilidade do tecido tumoral é fundamental.

### 1.1.6 Angiogênese em Oncologia

A angiogênese ocorre em várias situações fisiológicas como no desenvolvimento embrionário, no desenvolvimento do órgão genital feminino e no processo de cicatrização. Ela se dá em etapas: inicialmente ocorre a destruição da membrana basal por enzimas proteolíticas

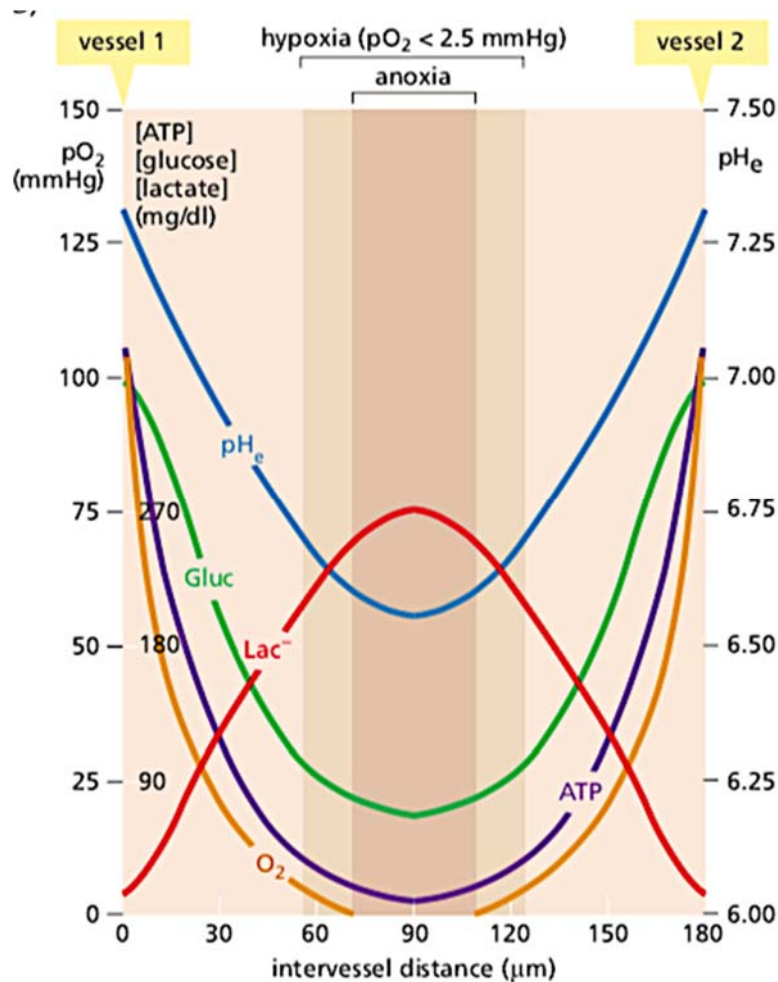
secretadas por células endoteliais; em seguida, estas células endoteliais estimulam a migração e proliferação de novas células endoteliais; após, observam-se canalização e formação de alças vasculares formando uma nova rede vascular e, finalmente, síntese de nova membrana basal. Estes novos vasos desenvolvem-se, então, graças a uma menor adesão entre as células endoteliais que permitem a participação de novas células no processo. Todo esta sequência do processo fisiológico depende de um equilíbrio entre agentes moduladores estimulantes e inibidores da angiogênese <sup>70,71</sup>.

Estes mesmos passos serão seguidos quando a angiogênese ocorre em situações patológicas como no desenvolvimento de neoplasias, porém sob forma descontrolada e ilimitada. Os primeiros conhecimentos a respeito da angiogênese nas neoplasias ocorreram nos carcinomas. Como estes representam cerca de 80% das neoplasias tenta-se adaptar, reproduzir e estudar a angiogênese a partir destes conhecimentos.

Com estes estudos compreendemos que células normais integrantes do tecido neoplásico são fundamentais para o entendimento da biologia tumoral <sup>72</sup>. Estas células, denominadas células do estroma neoplásico, são fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, adipócitos, macrófagos, linfócitos B, T e NK e mastócitos – todos membros da linhagem mesenquimal e do tecido imunológico e hematopoiético <sup>72,73</sup>. Isto significa que os tecidos neoplásicos não são formados apenas células neoplásicas, mas que há troca de informações entre as células neoplásicas e sua célula vizinha, dita estromal não neoplásica, ou seja, existe um controle da presença, proliferação e recrutamento das células estromais por parte das células neoplásicas e vice-versa. Por conseguinte, tanto em tecidos normais como neoplásicos a angiogênese depende de interações intercelulares, de fatores estimuladores e inibidores de proliferação celular, de sobrevivência celular e apoptose <sup>72,73</sup>. Assim, tanto células estromais normais como células neoplásicas exercem papéis em todos os estágios de desenvolvimento do tecido neoplásico através de fatores de crescimento, citocinas e quimoquinas <sup>72,73,74</sup>. Este cenário favorece o recrutamento de células endoteliais e inicia o processo de formação de vasos sanguíneos - a angiogênese.

Não há crescimento tumoral sem angiogênese. Sem as células endoteliais que se alinham para a formação das paredes dos capilares e de vasos sanguíneos não há suprimento de nutrientes e, principalmente, oxigênio adequados. Desde a década de 50 sabe-se que tecidos neoplásicos com distância superior a 0,2mm de vasos sanguíneos não se desenvolvem. Esta distância representa o percurso para difusão de oxigênio em tecidos vivos. Células para além desta distância sofrem pela falta de nutrientes, excesso de dióxido de carbono, aumento de ácido láctico, mas sobretudo, carência de oxigênio com consequente necrose. Esta barreira se rompe

a partir do momento em que a célula tumoral se torna capaz de produzir vasos. É o que se denomina “switch angiogênico” - marca da transição de uma fase avascular para uma fase vascular do tecido tumoral<sup>74</sup>. (Figura 5).



Fonte: Modificado de: Weinberg<sup>74</sup>

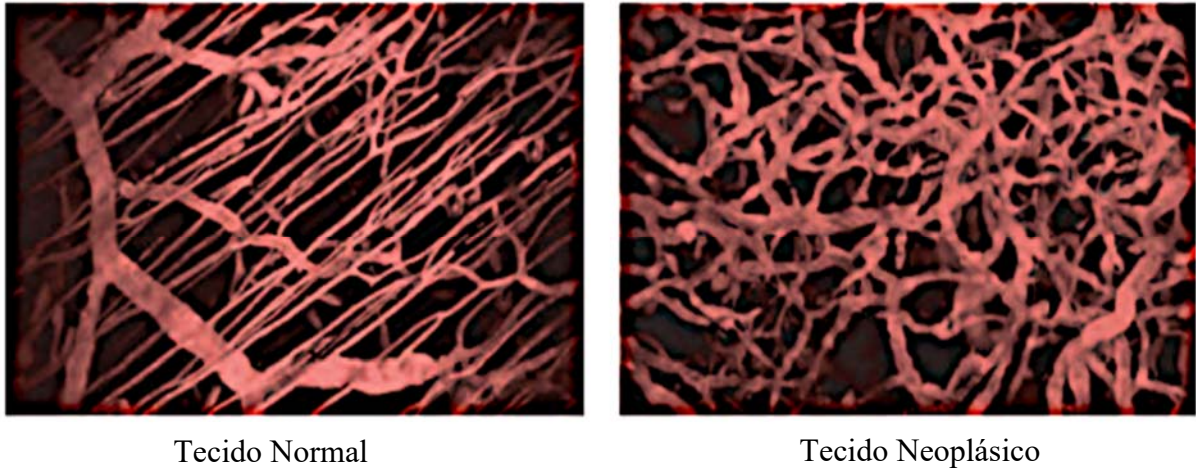
**Figura 5** - Medidas de 5 parâmetros indicativos das alterações que ocorrem com o aumento da distância entre células e microvasos. Os parâmetros foram calculados de acordo com 2 arteríolas correndo em paralelo separadas por 180 μm.

Assim, é principalmente a carência de oxigênio que estimula o recrutamento de células endoteliais e o crescimento e formação de vasos capilares. Para tanto, ganha destaque a proteína Fator Induzido pela Hipóxia-1 (HIF-1). O HIF-1 é um fator de transcrição cuja ação depende da junção 2 subunidades: HIF-1α e HIF-1β. Sob condições de tensão normal de oxigênio (normóxia) ocorre rápida degradação de HIF-1α, de modo que a proteína HIF-1 permanece inativa. No entanto, quando células se encontram sob condições de hipóxia a degradação de HIF-1α demora a ocorrer, sua concentração intracelular aumenta, HIF-1 torna-se ativo e leva a

expressão de vários genes alvo cujos produtos se envolverão na angiogênese <sup>72-75</sup>. Dos genes envolvidos na angiogênese estão os responsáveis pela produção do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Fator de Crescimento e Transformação Alfa (TGF- $\alpha$ ). Assim, VEGF atrai e estimula o crescimento de células endoteliais que construirão novos vasos enquanto PDGF e TGF- $\alpha$  estimulam células não endoteliais. Por conseguinte, a rede de capilares se arranja e se densifica a fim de tornar qualquer nutriente acessível a quaisquer células do tecido em formação. Este aumento de densidade na microvasculatura é, pois, uma demonstração da capacidade das interações no microambiente tecidual cuja intensidade e importância são ainda mais marcantes no tecido tumoral que no tecido normal.

No tecido neoplásico, uma vez iniciada, a angiogênese passa a ser um processo contínuo que envolve uma série de substâncias (VEGF, PDGF, TGF- $\alpha$ , Fator de Crescimento de Fibroblastos Beta (FGF- $\beta$ ), interleucina -8 (IL-8), angiopoetina e angiogenina) produzidas e liberadas de modo descoordenado e desproporcional.

Este cenário, embora confira aspecto pouco organizado da rede de capilares neoplásicos quando comparado àqueles dos tecidos normais, é condição para o progresso da invasão tumoral no órgão afetado. Isto pode ser demonstrado em tumores sólidos onde observa-se correlação entre concentração de VEGF, densidade microvascular (MDV) e prognóstico. Para mensuração da MDV diferentes técnicas foram desenvolvidas. Pode-se estimar o grau de angiogênese tecidual de modo que os microvasos podem ser observados através de imunohistoquímica com o uso dos marcadores, ou pode-se quantificar a MDV através da contagem de microvasos por campo ou pelo cálculo da porcentagem da área recoberta pelos microvasos <sup>74</sup>. Estas técnicas permitiram mostrar que o processo angiogênico não é homogeneamente distribuído por todo o tecido neoplásico pois observa-se histologicamente a presença de regiões hipervascularizadas, denominadas de “*hot spots*” enquanto em outras regiões este processo é pouco percebido. Assim, o uso da quantificação da MDV e a contagem dos microvasos através de “*hot spots*” demonstram que células neoplásicas em um mesmo tecido neoplásico não detêm a mesma capacidade de angiogênese <sup>72,74,76,77</sup> do mesmo modo que tecidos neoplásicos diferentes podem ter capacidade angiogênica distinta. (Figura 6)



Fonte: Modificado de Weinberg <sup>74</sup>

**Figura 6-** Duas fotos de microscopias em imagem de alta resolução da organização detalhada de microvasos em tecido normal x tecido neoplásico<sup>78</sup>

Deste modo, a correlação entre MDV e prognóstico observada em alguns carcinomas pode ser entendida de dois modos complementares: se por um lado a correlação existe porque quanto mais densa for a rede de capilares maior será a capacidade de fornecimento de nutrientes para as células tumorais crescerem e se multiplicarem, por outro lado a MDV elevada pode ser um marcador indireto de um fenótipo já, por si só, agressivo.

Além da interação entre células de diferentes capacidades angiogênicas em um mesmo tecido tumoral, para o entendimento da heterogeneidade do processo de angiogênese também deve ser levado em conta a presença fatores inibidores. Em um processo fisiológico, fatores estimuladores de angiogênese como VEGF e FGF- $\beta$  precisam ser contrabalanceados a partir do momento em que a rede de capilares atinja a densidade necessária. A supressão destes elementos pró-angiogênicos é, em parte, determinada pela supressão da síntese de HIF uma vez que com a neoformação vascular as condições de hipóxia desaparecem. Além disso, vários outros componentes da matriz extracelular atuam inibindo a angiogênese – entre eles destaca-se a Trombospondina -1 (Tsp-1) <sup>72,74,76,77</sup>.

A Tsp-1 é sintetizada e liberada por várias células no espaço extracelular e se liga ao receptor presente na membrana das células endoteliais denominado CD36. Esta interação suspende proliferação das células endoteliais. A síntese de Tsp-1 é induzida pela presença do gene TP53 com finalidade de inibir proliferação celular e tecidual anômalos. No entanto, mutação e perda de função deste gene leva a diminuição na síntese e na concentração de Tsp-1 com consequente incapacidade no bloqueio da angiogênese o que é ainda piorado quando da

presença do oncogene *Ras*, presente em carcinomas. Além da Tsp-1, fatores inibidores da angiogenese como interferon  $\alpha$  e  $\beta$ , angiostatina e endostatina entre outros também contrabalançam o processo de formação vascular tanto em ambiente fisiológico quanto tumoral<sup>78</sup>.

Deste modo, a angiogênese mostra-se um processo complexo, determinado por interações entre células neoplásicas e células não neoplásicas do microambiente tumoral. Estas interações acabam por determinar quando, onde e em que intensidade este processo ocorre. Embora a quantificação de MDV e angiogênese, bem como a importância do microambiente estejam melhor consolidados em neoplasias sólidas, a partir 1990 a importâncias deste microambiente foi evidenciado nos linfomas.

### 1.1.7 Angiogênese em Doenças Linfoproliferativas

Os linfomas reúnem mais de 60 doenças diferentes classificadas de acordo com seus aspectos clínicos, morfológicos, imunológicos e genéticos. A importância da angiogênese nas doenças linfoproliferativas tem sido estudada principalmente em relação ao seu impacto no prognóstico<sup>79,80</sup>.

No linfonodo normal uma densa rede de capilares está presente na região cortical enquanto nas regiões centro-foliculares existe pouca vascularização e este padrão também é observado nos linfonodos reacionais. No entanto, quando lidamos com linfomas, os experimentos “*in vitro*” demonstram a capacidade destas células induzirem maior proliferação de células endoteliais sugerindo a produção e liberação de substância pró-angiogênica<sup>80,81</sup>. Este padrão de resposta angiogênica também foi observado “*in vivo*”<sup>82</sup>. Outrossim, ao se comparar o que ocorre no linfonodo reacional com o que ocorre no linfoma, alguns autores mostraram não apenas que a MDV dos linfonodos é maior no segundo, mas que sua magnitude poderia correlacionar-se com agressividade clínica e tipo histológico<sup>83</sup>. Por conseguinte, a presença de MDV mostrou-se maior no Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB), agressivo, do que no Linfoma Folicular, frequentemente indolente<sup>84</sup>.

Contudo, alguns autores discordaram deste quadro e sugeriram que a magnitude da MDV é semelhante entre o quadro reacional e o neoplásico<sup>85</sup>. Além de discordâncias com relação a magnitude da MDV, também não se estabeleceram acordos entre MDV e o subtipo histológico ou à resposta ao tratamento e ao prognóstico<sup>86</sup>. Deste modo, há vários dados discrepantes pois, se por um lado a correlação entre MDV entre pacientes sensíveis e resistentes à quimioterapia empregada não foi obtido<sup>87</sup> e a relação entre VEGF e resposta ao tratamento em LDGCB não foi estabelecida<sup>88-90</sup> por outro, um aumento da MDV antes do início do

tratamento sugeriu melhor sobrevida livre de progressão e sobrevida global em pacientes com Linfoma Folicular <sup>91</sup> . Além disso, pacientes com Linfoma Folicular com elevada MDV apresentaram maior risco de progressão da doença e de transformação para LDGCB <sup>90-91</sup> .

Esta incongruência de resultados pode dever-se ao fato de muitos estudos terem agrupado populações heterogêneas com diferentes subtipos histológicos tornando pouco clara a significância clínica do aumento de MDV. Apesar disso, no LNH a concentração sérica elevada de VEGF foi considerada fator prognóstico de sobrevida em análise multivariada<sup>92</sup> e tanto em LNH- B quanto em LNH- T uma correlação negativa entre concentração sérica de VEGF anterior ao início do tratamento e sobrevida global foi estabelecida<sup>93</sup>. Esta correlação também foi obtida em pacientes com Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) tratados com CHOP<sup>94</sup>. Além da concentração sérica, a expressão tecidual elevada de VEGF também tem apresentado correlação negativa em vários linfomas como LDGCB, Linfoma de Células T Periféricas, Leucemia Linfocítica Crônica/Linfoma de Pequenos Linfócitos <sup>95-98</sup>. Estes dados estimularam o uso de anti-VEGF (bevacizumabe) em associação a R-CHOP a cada 14 dias para tratamento de LDGCB. Embora os resultados “in vitro” fossem estimulantes, os resultados “in vivo” foram desapontadores <sup>99</sup> e sendo assim, não houve maior interesse na insistência deste campo.

## 2 JUSTIFICATIVA

Novos estudos a respeito da angiogênese são fundamentais.

Se, por um lado, a ruptura do microambiente tumoral já mostrou ser alternativa viável para tratamento de neoplasias, uma vez que sua desagregação pode auxiliar no tratamento destes pacientes, a angiogênese que tem papel fundamental na estabilidade do microambiente tumoral e na sobrevivência tumoral, precisa ser melhor entendida.

Por outro lado, no Brasil há poucos estudos em LCM. Sua prevalência, seus aspectos clínicos e laboratoriais são pouco conhecidos em nosso meio. Deste modo, acabamos por empregar fatores prognósticos estudados há cerca de 20 anos, quando recursos de tratamento atualmente empregados não eram disponíveis e que não foram moldados a nossa população. Paralelamente, tratamentos mais intensivos que possibilitaram o aumento de sobrevida global verificado nos pacientes de LCM acabaram por beneficiar predominantemente apenas uma parcela destes pacientes. Pacientes não submetidos a TACTH, mais idosos e mais frágeis têm ainda poucas alternativas para tratamento.

Assim, tanto quanto os estudos em LCM no Brasil, sua avaliação no que tange a MDV ainda permanece pouco explorada. Embora avaliações e quantificações de angiogênese já foram realizados em vários subtipos de LNH, estudos que avaliem somente a população de LCM apenas recentemente<sup>100-102</sup> ganharam importância na tentativa de correlacionar entre prognóstico, recidiva e refratariedade do LCM com o grau de angiogênese, porém os resultados ainda permanecem controversos.

Assim, o acréscimo de conhecimento nesta área pode oferecer a possibilidade do uso de medicações com efeito anti-angiogênico seja de modo isolado ou em associação às modalidades terapêuticas já empregadas. Este sinergismo pode resultar em maior número de opções de tratamento e maior tempo de vida a portadores de uma doença reconhecidamente agressiva e sabidamente incurável.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Correlacionar a microdensidade vascular com a sobrevida global em pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Caracterizar demográfica e clinicamente os pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto tratados no A.C.Camargo Cancer Center;
- b) Avaliar a densidade microvascular em casos de Linfoma de Células do Manto;
- c) Identificar fatores prognósticos relacionados a sobrevida global;
- d) Identificar modelo preditivo de mortalidade com fatores demográficos, clínicos e imuno-histoquímicos em Linfoma de Células do Manto.

## **4 MÉTODOS**

### **4.1 DESENHO DE ESTUDO**

Este foi um estudo retrospectivo observacional conduzido pelo Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center

Este trabalho foi submetido à avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) e em seres humanos da Fundação Antonio Prudente do A.C.Camargo Cancer de São Paulo e foi obtida aprovação sob número 2.245/16 datada de 03 de novembro de 2016. (Anexo 1)

### **4.2 ESTRATÉGIA DE BUSCA DE PACIENTES**

Os casos de Linfoma de Células do Manto foram selecionados a partir de banco de dados pré-existente no A.C.Camargo Cancer Center em período correspondente a definição de diagnóstico de janeiro de 2006 a dezembro de 2014. O diagnóstico de Linfoma de Células do Manto obedeceu a critérios histopatológicos estabelecidos pela Classificação da OMS<sup>4</sup>.

Foram obtidos inicialmente 91 casos. Treze foram excluídos por terem sido considerados clinicamente como Linfoma de Células do Manto Indolente. Dos 78 casos restantes, 11 foram excluídos por não apresentarem amostra histológica, 3 foram excluídos por não apresentarem quaisquer dados clínicos e 1 foi excluído por ter sido diagnosticado como Linfoma de Pequenos Linfócitos após revisão. Deste modo foram analisados 63 pacientes que obedeceram aos seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- **Critérios de inclusão:**
  - Informações adequadas em prontuário além de nome e gênero;
  - Material obtido em anátomopatológico de sítio nodal ou extranodal com exceção de medula óssea.
- **Critérios de exclusão**
  - Casos que não tiveram seguimento no Serviço de Hematologia do A.C.Camargo Cancer Center;

- Casos sem amostras histológicas no laboratório de anatomia patológica do A.C.Camargo Cancer Center;
- Casos considerados como Linfoma de Células do Manto indolente;
- Casos cujo único material de confirmação de diagnóstico foi análise anátomopatológica ou imunofenotípica da medula óssea ou sangue periférico;
- Casos em pacientes com sorologia positiva para HIV, Hepatite B ou Hepatite C.

Sessenta e três pacientes respeitaram todos os critérios e tiveram seus dados prévios ao início de tratamento revisados e tabulados. Estes dados incluem:

- Variáveis demográficas: gênero e idade;
- Variáveis referentes exame clínico: estadiamento por Ann Arbor, presença de massa volumosa acima de 7,5cm, presença de sintomas sistêmicos, presença de esplenomegalia definida ao exame físico ou por qualquer método radiológico, presença de comprometimento extranodal, *performance status* de acordo com a escala do *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG).

Consideramos como sintomas sistêmicos: febre vespertina com temperatura igual ou superior a 37,8°C, emagrecimento superior a 10% do peso corporal em período de pelo menos 3 meses e sudorese noturna abundante;

- Variáveis laboratoriais: concentração de hemoglobina; quantificação de leucócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas; concentração de albumina e concentração de DHL.

A metodologia para quantificação de concentração de DHL variou de acordo com o período em que o paciente foi atendido. Nos casos correspondentes ao período de 2011 a 2016 foi utilizada a metodologia enzimática (lactato-piruvato) cujo valor máximo de referência é de 246 U/l enquanto em períodos diferentes deste a metodologia utilizada foi a cinética por luz ultra-violeta cujo valor máximo de referência é de 480U/l. Deste modo, também utilizamos como variável a razão entre o valor de DHL obtido e o respectivo valor máximo de referência de acordo com a metodologia utilizada;

- Variáveis referentes a prognóstico: Índice de proliferação celular por KI-67, Índice Prognóstico para Linfoma de Células do Manto (MIPI), Índice Prognóstico para Linfoma de Células do Manto simplificado (MIPI-s), Índice Prognóstico para Linfoma de Células do Manto- biológico (MIPI-b).

O cálculo de MIPI e MIPI-b foram feitos de acordo com programa “*Calculate by QxMD*” desenvolvido por *QxMD Medical Software*;

- Variáveis referentes a tratamento. Para tanto, consideramos a base da quimioterapia inicial. Esta base foi denominada como citarabina quando o paciente se submeteu a qualquer esquema que contivesse citarabina em dose igual ou superior a  $1\text{g/m}^2$ , isto é, R-HiperCVAD/MA, R-Maxi-CHOP/HA ou R-DHAP; foi chamada antracíclico apenas aquela em que o paciente recebeu R-CHOP ou semelhante; foi denominada como análogos de purina aquelas em que o paciente recebeu R-FC ou semelhante e definida como inibidor de proteassoma qualquer esquema que contivesse bortezomibe. Quaisquer outros esquemas de tratamento utilizados foram classificados como “outros”.
- Variáveis referentes a resposta ao tratamento: uma vez que os dados foram coletados a partir de 2006, foi utilizado critérios de acordo com critérios de resposta estabelecidos por “*International Workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin lymphoma*” de Cheson, et al. 1999 (Anexo 4) segundo relato de prontuário.

Deste modo, a resposta ao tratamento foi classificada como: completa confirmada; completa não confirmada; parcial; refratária ou em progressão.

Não houve reavaliação radiológica ou readaptação para critérios de resposta estabelecidos posteriormente.

- variáveis referentes a realização ou não de TACTH em primeira remissão.
- variáveis referentes a data óbito.

Dos 63 pacientes que obedeceram aos respectivos critérios de inclusão para análise de variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais, 34 apresentaram amostra histológica para submeterem-se a avaliação de microdensidade vascular

## 4.3 ANÁLISE PATOLÓGICA

### 4.3.1 Revisão Histopatológica

A primeira fase do estudo consistiu na separação dos blocos de parafina e respectivas lâminas histológicas coradas com hematoxilina-eosina. Todos os casos foram revisados por patologistas e definiu-se o diagnóstico de Linfoma de Células do Manto de acordo com os critérios histopatológicos estabelecidos pela Classificação da OMS de 2016<sup>4</sup>,

Após a leitura dos cortes corados com hematoxilina-eosina foi iniciada a avaliação da qualidade das amostras de tumor obtidas para confecção das micromatizes teciduais (TMA).

#### **4.3.2 Procedimentos para a construção do arranjo das micromatizes teciduais**

As áreas de interesse para o estudo foram selecionadas e circundadas nas lâminas que serviram para o diagnóstico. Como imagem em espelho as lâminas foram postas sobre os blocos de parafina correspondentes e a mesma área previamente marcada em cada uma das lâminas histológicas foi transferida para o bloco de parafina que então passou a ser denominado bloco doador.

Escolhidas as áreas em cada um dos blocos, os números foram postos em sequência confeccionada no programa de computador (*Excell 10 Windows xp – Microsoft*) com eixo XY que se refere a coluna e linha respectivamente de tal modo a servir para ordenação do arranjo tecidual em matriz (Figura 7).

A partir daí se iniciou a confecção do bloco de TMA e os blocos doadores dos pacientes do estudo foram levados ao aparelho de precisão para perfuração. Assim, fez-se o primeiro furo em um bloco novo de parafina (em branco), denominado a partir de então como bloco receptor, com sistema de agulhas com 1,0 mm de diâmetro interno. A seguir, perfurou-se com a agulha o primeiro bloco doador e este tecido foi implantado na respectiva cavidade previamente aberta no bloco receptor. Deste mesmo modo procedeu-se sucessiva e ordenadamente: retirada de amostras de cada um dos blocos doadores com tecido tumoral e seu implante no bloco receptor. Ao final, obteve-se um único bloco receptor contendo as sequências diferentes dos blocos em estudo.

O bloco receptor foi cortado em micrótomo de parafina. Os cortes obtidos foram colados em fita adesiva especial para a técnica de arranjo de micromatizes teciduais. Os cortes histológicos em cinco micrômetros aderidos à fita adesiva foram numerados e marcados sobre as lâminas especiais. Os cortes foram tratados com luz ultravioleta e solvente químico para soltar a fita adesiva e apenas os cortes histológicos permaneceram nas lâminas. Os cortes foram recobertos com parafina e armazenados em congelador para conservação.

|    |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
|----|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|    | 0        | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8        | 9        | 10       | 11       | 12       | 13       | 14       | 15       |
| 0  |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 1  |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 2  |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 3  |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 4  |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 5  |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 6  | Fígado   | 911538  | 911538  | 917636  | 924032  | 934604  | 940568  | 1024548 | 1025001  | 1029896  | 1106626  | 1112287  | 1118596  | 1121264  | 1121876  | 1122346  |
| 7  | Revisão  | Revisão | Revisão | AB      | AA      | Revisão | AC      | AC      | AB       | AA       | Revisão  | AM       | Revisão  | Revisão  | AA       | Revisão  |
| 8  | 1131860  | 1135433 | 1145624 | 1145967 | 1202360 | 1210636 | 1213119 | 1224397 | 1227583  | 1227761  | 1240296  | 1241293  | 1257216  | 1304177  | 1305744  | 1308244  |
| 9  | Revisão  | Revisão | Revisão | Revisão | AA      | Revisão | AC      | AD      | Revisão  | Revisão  | AD       | Revisão  | AF       | Revisão  | AAA      | BAA      |
| 10 | 1308224  | 1361983 | 1362998 | 1365112 | 1375648 | 1379501 | 1388230 | 1390429 | 14043929 | 14062670 | 14077641 | 14080131 | 14080710 | 14107052 | 14108567 | 14110676 |
| 11 | CAA      | Revisão | AAA     | AAA     | BAA     | Revisão | Revisão | Revisão | AAA      | AAA      | Revisão  | Revisão  | AAA      | BAB      | AAA      | AAD      |
| 12 | 15/14022 |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 13 | Revisão  |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 14 |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 15 |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 16 |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 17 |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 18 |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 19 |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 20 |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 21 |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 22 |          |         |         |         |         |         |         |         |          |          |          |          |          |          |          |          |

Autor: Dr. Frederico/Dr. Felipe D'Almeida  
(LCH) Unifone de Ciências do Norte

Obs: blocos do HC Camargo Cancer Center

Março de 2018

**Figura 7** - Planilha original de posicionamento dos cortes histológicos de todos os blocos dos pacientes envolvidos no estudo.

Casos ordenados horizontalmente pelo número de bloco em parafina das amostras dos tumores. A posição 00 superior e inferior representam cortes de fígado para controle interno. A planilha foi executada no programa de computador Excell, Windows xp-Microsoft.

Para demonstração da qualidade das amostras de tumor obtidas para TMA cortes em dois níveis do bloco receptor foram corados com hematoxilina-eosina. As lâminas com o número mais baixo de cada marcador representaram os cortes mais superficiais (nível 1) e as lâminas com o número mais alto de marcador representavam os cortes do nível mais profundo (nível 2). Os controles positivos, externo e interno, atestaram a qualidade das reações.

#### 4.3.3 Procedimentos para a realização da técnica de imuno-histoquímica

As lâminas preparadas segundo a técnica do TMA foram submetidas a retirada de parafina e preparadas por passagens sucessivas em xilol e etanol. Posteriormente foram submetidas à recuperação antigênica. A seguir, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de Peróxido de Hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 volumes) com três trocas de 5 minutos cada. As lâminas foram incubadas com anticorpos primários nas diluições pré-

estabelecidas em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% e azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), 0,1% por 2 horas, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após incubação, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas a cada 5 minutos. Posteriormente, as lâminas contendo os cortes histológicos foram incubadas com o *Link* (DAKO A/S, K0690, Denmark) por 30 minutos em temperatura ambiente seguidas por 3 lavagens de 5 minutos em PBS e incubação com streptividina (HRP 9DAKO A/S, Denmark) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação as lâminas foram novamente lavadas com tampão PBS por 3 a 5 minutos, reveladas com solução de diaminobenzidina por 5 minutos e coradas com hematoxilina de Harris.

O estudo imuno-histoquímico foi realizado com 9 marcadores em dois níveis de corte do bloco da técnica do TMA para cada marcador. A distância entre os cortes do nível superficial (nível 1) e do nível profundo (nível 2) foi de 360 a 400 micrômetros.

**Tabela 3** - Dados técnicos referentes aos anticorpos primários usados na reação imunohistoquímica.

| Anticorpo  | Clone    | Fabricante | Código   | Título | Recuperação | Solução       | pH | Tempo |
|------------|----------|------------|----------|--------|-------------|---------------|----|-------|
| CD20       | L26      | VENTANA    | 760-2531 | FRASCO | 36CC1/ 32AB | Tris/Alcalino | 9  | 36'   |
| CD5        | SP19     | VENTANA    | 790-4451 | FRASCO | 36CC1/ 32AB | Tris/Alcalino | 9  | 36'   |
| CD23       | SP23     | VENTANA    | 790-4408 | FRASCO | 36CC1/ 32AB | Tris/Alcalino | 9  | 36'   |
| Ciclina D1 | SP4      | VENTANA    | 790-4508 | FRASCO | 36CC1/ 48AB | Tris/Alcalino | 9  | 36'   |
| Ki67       | 30.9     | VENTANA    | 790-4286 | FRASCO | 64CC1/16AB  | Tris/Alcalino | 9  | 36'   |
| P53        | DO-7     | VENTANA    | 800-2912 | FRASCO | 36/CC1/32AB | Tris/Alcalino | 9  | 36'   |
| CD34       | QBEnd/10 | VENTANA    | 790-2927 | FRASCO | 36CC1/32/AB | Tris/Alcalino | 9  | 36'   |
| VEGF       | VG-1     | Abcam      | Ab1316   | 1/100  | 30cc1/32AB  | Tris/Alcalino | 9  | 30'   |
| HIF-alfa   | 1 A 3    | Abcam      | AB113642 | 1/500  | 30CC1/32AB  | Tris/Alcalino | 9  | 30'   |

A leitura sempre foi iniciada a partir da sequência de amostras da parte superior da lâmina (A). A seguir foi avaliada a sequência inferior na mesma lâmina (B). A leitura dos marcadores do TMA foi iniciada com aumento 100X para a avaliação dos critérios de intensidade da coloração à imunohistoquímica. Em seguida, para confirmação dos achados, foi utilizado o aumento de 400X. Casos os resultados fossem distintos, sempre se optou pelo resultado maior.

Os elementos histopatológicos e imunohistoquímicos avaliados na leitura das lâminas do arranjo tecidual em matriz foram:

- reação para os marcadores para diagnóstico de Linfoma de Células do Manto CD20, CD5, CD23 e CiclinaD1 (Figura 2).

Foram considerados positivos os casos de acordo com a Tabela 4.

- reação para o marcador de microdensidade vascular, CD34, e os marcadores de angiogênese, HIF- $\alpha$ , VEGF, que foram considerados positivos de acordo com o exposto na Tabela 4.

**Tabela 4** - Dados de positividade e coloração referentes aos anticorpos primários usados na reação imunohistoquímica

| Proteína      | Positividade                                                                                                                                                                                                            | Coloração      |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| CD20          | Expressão forte de membrana em mais de 90% das células neoplásicas                                                                                                                                                      | Membrana       |
| CD5           | Expressão de qualquer intensidade na membrana de mais de 70% das células neoplásicas (comparando com os linfócitos T como controle interno).                                                                            | Membrana       |
| CD23          | Expressão de qualquer intensidade na membrana de mais de 70% das células neoplásicas. Avaliação da expressão na trama de células dendríticas foliculares, com padrão de expressão "dendrítico" de qualquer intensidade. | Membrana       |
| Ciclina D1    | Expressão moderada a forte em mais de 80% das células neoplásicas                                                                                                                                                       | Nuclear        |
| Ki67          | Porcentagem das células neoplásicas com qualquer intensidade de expressão nuclear.                                                                                                                                      | Nuclear        |
| SOX-11        | Expressão moderada a forte em mais de 80% das células neoplásicas                                                                                                                                                       | Nuclear        |
| P53           | Porcentagem das células neoplásicas com qualquer intensidade de expressão nuclear.                                                                                                                                      | Nuclear        |
| CD34          | Contagem em áreas de "hot spots" através de gradícula. Um vaso foi considerado contável na amostra se ocupando a linha divisória entre os quadros da gradícula                                                          | citoplasmática |
| VEGF          | Expressões inferiores a 10%, e iguais ou acima de 10%                                                                                                                                                                   | citoplasmática |
| HIF- $\alpha$ | Expressões inferiores a 10%, e iguais ou acima de 10%                                                                                                                                                                   | citoplasmática |

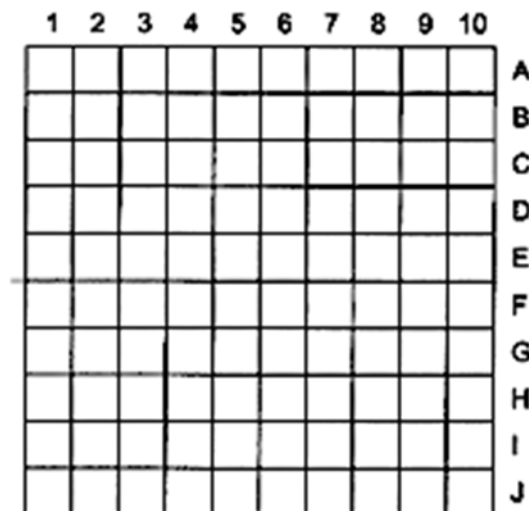
As anotações da planilha de leitura manuscrita foram posteriormente repassadas para que todos os dados pudessem ser cruzados e permitissem posterior avaliação estatística.

#### 4.3.4 Procedimentos para a contagem de microvasos

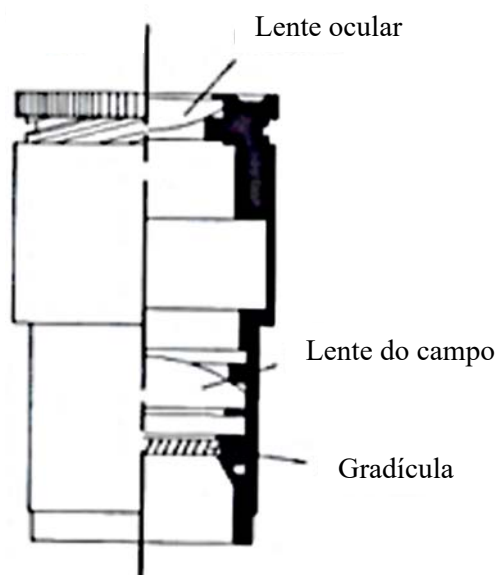
A avaliação da densidade microvascular foi feita através de marcadores de angiogênese (HIF- $\alpha$  e VEGF) e marcador que quantificou a microdensidade vascular - avaliação uniforme e randômica em lâminas marcadas com anticorpo CD34.

Uma gradícula foi aplicada a cada corte para estimar o número de microvasos por cada unidade de área. Os casos foram avaliados em 20HPF e a quantidade de microvasos por área expressa em mm<sup>2</sup>.

Um vaso foi considerado contável em qualquer perfil de células endoteliais positivas para CD34 isoladas ou em grupos separados de microvasos adjacentes, células tumorais ou elementos de tecido conjuntivo adjacente e desde que totalmente incluídos na amostra se ocupando a linha divisória entre os quadros da gradícula (Figura 8 e 9). Para cada amostra obtivemos 2 resultados e quando estes resultados diferiam optou-se sempre pelo maior.



**Figura 8** - Esquema de gradícula para estimar o número de microvasos por cada unidade de área. Um vaso é considerado contável na amostra se ocupa a linha divisória entre os quadros da gradícula



**Figura 9** - Posicionamento de colocação da gradícula em microscópio ótico para contagem de microvasos

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva das variáveis. Para as variáveis qualitativas foram apresentadas as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%) e para as variáveis quantitativas foram apresentadas as principais medidas-resumo, isto é, média, desvio padrão, mediana e valores mínimo e máximo.

No caso de variáveis contínuas optamos por definir 2 grupos de observação divididos por um ponto de corte. A determinação de um único ponto de corte foi estimada utilizando o método de Lausen e Schumacher<sup>105</sup>. Essa proposta visou obter o melhor valor de ponto de corte (*cut-off*) com o objetivo de discriminar as curvas de sobrevivência. A estimativa do ponto de corte foi obtida por meio da maximização da estatística *log-rank* padronizada. Uma vez estimado o ponto de corte, a função de sobrevivência foi estimada utilizando o estimador de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevivência estimadas foram comparadas por meio do teste *log-rank*.

Definimos Sobrevida Global como o tempo decorrido entre o diagnóstico definido pela data do laudo da anatomia patológica até o último contato ou óbito por qualquer causa.

O modelo de riscos proporcionais de Cox foi ajustado aos dados para descrever a relação entre as variáveis independentes e o tempo até o óbito.

A seleção das variáveis para o modelo de regressão de Cox múltiplo foi considerada a partir dos resultados do modelo de Cox simples. Consideramos todas as variáveis com valor

de  $p$  inferior a 0,05, bem como aquelas com relevância clínica mesmo que valor  $p > 0,05$ . As variáveis do modelo de regressão de Cox múltiplo (modelo final) foram selecionadas a partir do método de *stepwise backward* com  $p$  de entrada de 0,10, obtendo, assim, o modelo final.

Em todos os modelos, foi avaliada a suposição de proporcionalidade por meio dos resíduos de Schoenfeld <sup>107</sup>, Grambsch e Therneau <sup>108</sup>.

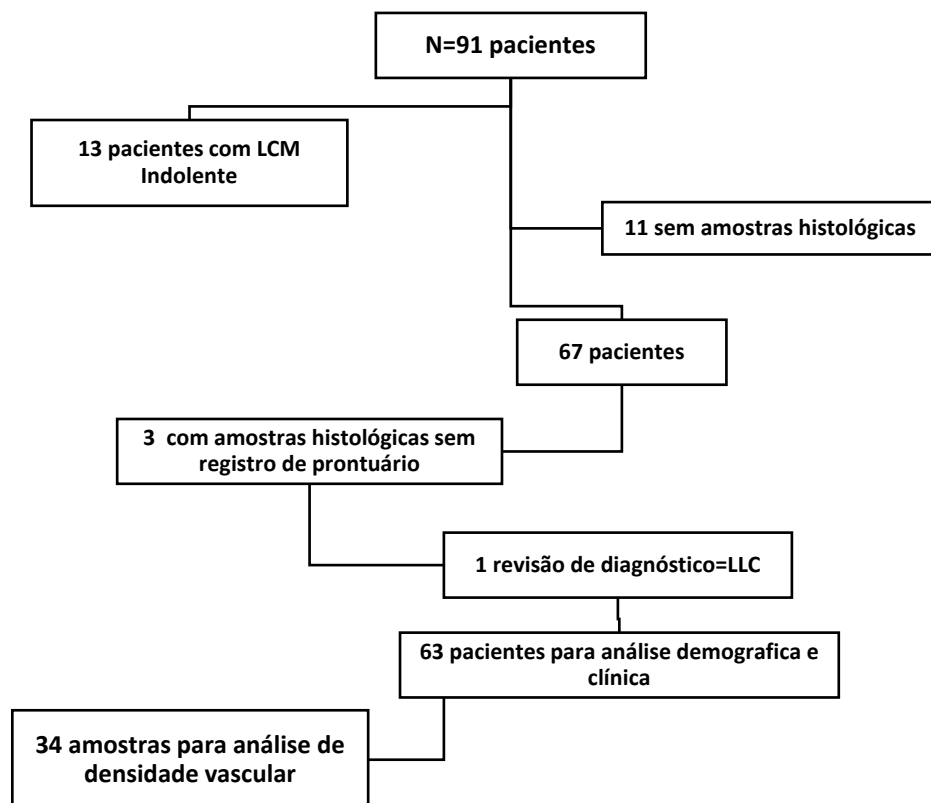
Em todos os casos, houve evidências de que o efeito das covariáveis foram constantes ao longo do tempo, justificando, assim, o uso do modelo de Cox.

O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, os resultados com valor de  $p$  inferior a 0,05 foram considerados significativos. A análise dos dados foi realizada por meio do *software* R versão 3.5 e do *software* SPSS versão 24.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

De janeiro de 2006 a dezembro de 2014 obtivemos 91 casos com diagnóstico de Linfoma de Células do Manto. Destes, 13 foram excluídos por terem sido clinicamente classificados como Linfoma de Células do Manto Indolente, onze casos foram excluídos por não haver disponibilidade de amostra histológica, 3 foram excluídos por não haver qualquer registro de dado clínico em prontuário além do nome e 1 caso foi excluído por ter tido diagnóstico de Linfoma de Pequenos Linfócitos após revisão histológica (Figura 10). Deste modo, 63 pacientes obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão. Destes 63 casos, 34 submeteram-se a avaliação de microdensidade vascular e angiogênese.



**Figura 10** - Fluxograma dos casos envolvidos no estudo. Os casos de LCM foram selecionados a partir de um banco de dados e de um arquivo de blocos de parafina existente no Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center.

As informações dos 63 pacientes de acordo com variáveis demográficas e clínicas estão resumidas na Tabelas 5 e 6.

A idade variou de 33 a 93 anos com mediana de 64 anos, desvio padrão de 12,05 anos e média de 63,14 anos (Tabela 5). Com relação ao gênero houve predominância do sexo masculino em proporção 2,15:1 - encontramos 43 (68,30%) pacientes do sexo masculino e 20 (31,70%) pacientes do sexo feminino (Tabela 6). No que tange ao estadiamento de Ann Arbor em 1 caso os dados não foram encontrados e dos 62 casos restantes, 51(81,00%) já se encontravam em estágio IV, 9 (14,30%) se encontravam em estágio III e 2 (3,20%) em estágio II ao diagnóstico. A presença de massa volumosa ao diagnóstico foi constatada em 9 (14,30%) pacientes, não observada em 49 (77,8%) dos casos e em 5 casos não foram encontrados dados em prontuários. Com relação a presença de sintomas sistêmicos ao diagnóstico, em 48 (76,20%) pacientes eles não foram relatados enquanto 13 (20,60%) já os apresentavam enquanto em 2(3,2%) não houve descrição em prontuário. A descrição de presença ou não de comprometimento extranodal foi obtido em prontuários de 62 pacientes e nestes o acometimento foi comprovado em 23 (36,50%) estando ausente em 39 (61,90%) casos. Dos locais de comprometimento extranodal, excetuando-se medula óssea e baço, o mais comum foi tubo gastrointestinal – presente em 10 (15,87%) pacientes. A presença ou não de esplenomegalia foi relatado em 62 casos e nestes foi observado aumento do baço em 12 (19,00%) e, por consequência, ausente em 50 (79,40%). No que concerne a “*performance status*” de acordo com índice ECOG obtivemos dados em 62 prontuários e ele foi 0 ou 1 em 58 (92,00 %) casos, 2 em 2 (3,20%) casos e 3 em outros 2 (3,20%) casos (Tabela 6).

**Tabela 5** - Frequência das variáveis de acordo com idade em anos

| Variavel | N  | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | Média |
|----------|----|---------------|---------|--------|--------|-------|
| Idade    | 63 | 12,05         | 64      | 33     | 93     | 63,14 |

**Tabela 6** - Frequência das variáveis demográficas e clínicas

| Variável                     | Categoria     | N  | (%)  |
|------------------------------|---------------|----|------|
| Gênero                       | Masculino     | 43 | 68,3 |
|                              | Feminino      | 20 | 31,7 |
| Estadiamento                 | I             | 0  | 0    |
|                              | II            | 2  | 3,2  |
|                              | III           | 9  | 14,3 |
|                              | IV            | 51 | 81,0 |
|                              | Não avaliados | 1  | 1,6  |
| Sintomas Constitucionais     | Sim           | 48 | 76,2 |
|                              | Não           | 13 | 20,6 |
|                              | Não avaliados | 2  | 3,2  |
| Presença de Massa Volumosa   | Sim           | 9  | 14,3 |
|                              | Não           | 49 | 77,8 |
|                              | Não avaliados | 5  | 7,9  |
| Esplenomegalia               | Sim           | 12 | 19,0 |
|                              | Não           | 50 | 79,4 |
|                              | Não avaliados | 1  | 1,6  |
| Presença de Sítio Extranodal | Sim           | 23 | 36,5 |
|                              | Não           | 39 | 61,9 |
|                              | Não avaliados | 1  | 1,6  |
| ECOG                         | 0-1           | 58 | 92,0 |
|                              | $\geq 2$      | 4  | 6,4  |
|                              | Não avaliados | 1  | 1,6  |

Dados obtidos de exames laboratoriais anteriores ao início de tratamento podem ser observados na Tabela 7. Estes dados mostraram que a concentração de hemoglobina variou de 8,80 g/dl a 16,40 g/dl com mediana de 12,80 g/dl, desvio-padrão de 1,82 e média de 12,79 g/dl. O número de leucócitos variou de  $2,44 \times 10^9/l$  a  $26,00 \times 10^9/l$ , com mediana de  $6,30 \times 10^9/l$ , desvio-padrão de  $4,23 \times 10^9/l$  e média de  $7,71 \times 10^9/l$ . Dentre os leucócitos, o número de linfócitos obtido de 59 dos 63 prontuários variou de  $2,00 \times 10^9/l$  a  $17,89 \times 10^9/l$  com mediana de  $1,47 \times 10^9/l$ , desvio-padrão de 2,95 e média de  $2,39 \times 10^9/l$  enquanto o número de monócitos obtido de 57 dos 63 prontuários variou de  $0,118 \times 10^9/l$  a  $1,098 \times 10^9/l$  com mediana de  $0,356 \times 10^9/l$ , desvio-padrão de  $1,79 \times 10^9/l$  e média de  $0,398 \times 10^9/l$ . O número mínimo de plaquetas relatado entre os 63 prontuários foi  $59,00 \times 10^9/l$  enquanto o número máximo foi  $464,00 \times 10^9/l$  com mediana de  $195,00 \times 10^9/l$ , desvio-padrão de 87,73 e média de  $205,50 \times 10^9/l$ .

Também foram obtidos dados referentes a concentração de DHL e de albumina. O valor de concentração de albumina prévio ao início de tratamento em 55 dos 63 prontuários variou de  $3,00 \times 10^3$  g/dl a  $5,10 \times 10^3$  g/dl com mediana de  $3,90 \times 10^3$  g/dl, desvio-padrão de  $0,454 \times 10^3$  g/dl e média de  $3,98 \times 10^3$  g/dl. A quantificação da concentração de DHL foi realizada por 2 diferentes métodos: pelo método cinético em 35 (55,55%) dos pacientes e pelo método enzimático em 26 (41,27%) dos pacientes. Os primeiros apresentaram valor mínimo de 159U/l, valor máximo de 666U/l, média de 254U/l e mediana de 243U/l enquanto os últimos mostraram valor mínimo de 132U/l e valor máximo de 754U/l com mediana de 240U/l e média de 278,04 U/l. Como a quantificação da concentração de DHL ocorreu por 2 métodos diferentes, a avaliação deu-se através da relação entre o valor obtido e seu respectivo valor máximo de normalidade. Dois casos (3,17%) não apresentaram dados referentes ao valor de concentração de DHL antes do início do tratamento. Estes 2 casos também não foram avaliados quanto aos índices de prognóstico MIPI-b e MIPI uma vez que a concentração de DHL faz parte do cálculo destes índices.

**Tabela 7** - Frequência das variáveis laboratoriais

| Variável                       | N  | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo  | Média  |
|--------------------------------|----|---------------|---------|--------|---------|--------|
| Hemoglobina (g/dl)             | 63 | 1,82          | 12,80   | 8,80   | 16,40   | 12,79  |
| Leucócitos ( $\times 10^9$ /l) | 63 | 4,23          | 6,30    | 2,44   | 26,00   | 7,71   |
| Linfócitos ( $\times 10^6$ /l) | 59 | 295,00        | 1474,00 | 200,00 | 1789,00 | 239,00 |
| Monócitos ( $\times 10^6$ /l)  | 57 | 179,00        | 356,00  | 118,00 | 1098,00 | 398,00 |
| Plaquetas ( $\times 10^6$ /l)  | 63 | 87,73         | 195,00  | 59,00  | 464,00  | 205,50 |
| DHL /VSN DHL*                  | 61 | 0,423         | 0,86    | 0,28   | 2,71    | 0,861  |
| Albumina(g/dl)                 | 55 | 0,454         | 3,90    | 3,00   | 5,10    | 3,98   |

\*Relação entre concentração obtida de DHL e seu respectivo valor máximo de normalidade de acordo com o método obtido

Deste modo, MIPI e MIPI-b foram obtidos em 61 pacientes. O primeiro apresentou valor mínimo de 4,50 e valor máximo de 7,50 tendo como mediana 5,70, desvio-padrão de 0,617 e média 5,67 enquanto o segundo mostrou valor mínimo de 4,7, valor máximo de 9,1, mediana de 6,20, desvio-padrão de 0,9174 e média de 6,321 (Tabela 8). Ao utilizarmos os índices simplificados, dos 61 casos 30 (49,18%) mostraram MIPI-s de baixo risco, 17(27,84%) apresentaram MIPI-s de risco intermediário e 14 (22,95%) de alto risco. Já com relação ao

MIPIb-s, 13(21,31%) casos mostraram-se de baixo risco, 26(42,62%) de risco intermediário e 22(36,06%) de alto-risco (Tabela 9).

**Tabela 8** - Frequência das variáveis de acordo com índices prognósticos

| Variável           | N  | Categoria           | N  | (%)   |
|--------------------|----|---------------------|----|-------|
| MIPI-simplificado  | 61 | Baixo Risco         | 30 | 49,18 |
|                    |    | Risco Intermediário | 17 | 27,87 |
|                    |    | Alto Risco          | 14 | 22,95 |
| MIPIb simplificado | 61 | Baixo Risco         | 13 | 21,31 |
|                    |    | Risco Intermediário | 26 | 42,62 |
|                    |    | Alto Risco          | 22 | 36,06 |

**Tabela 9** - Frequência das variáveis de acordo com índices prognósticos simplificados

| Variável | N  | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | Média |
|----------|----|---------------|---------|--------|--------|-------|
| MIPI     | 61 | 0,6173        | 5,70    | 4,50   | 7,50   | 5,67  |
| MIPI-b   | 61 | 0,9174        | 6,20    | 4,70   | 9,10   | 6,32  |

No que tange a questão do tratamento inicial este pode ser observado na Tabelas 10 e 11. Dos 63 casos 28(44,44%) submeteram-se a programação de tratamento que tinha por base citarabina em alta dose, 17(26,98%) foram tratados com combinações cuja base foi doxorubicina, 7 (11,11%) foram submetidos tratamento cuja base foi fludarabina, a 5 pacientes (7,93%) foi administrado esquema cuja base foi bortezomibe e a 4 (6,34%) foi feita outra programação. Em 2(3,2%) casos esta informação não foi obtida (Tabela 10). Com relação ao uso de transplante autólogo de medula óssea, este foi realizado em 23 (36,5%) dos pacientes e 33(52,4%) dos pacientes não se submeteram ao procedimento. Em 7 (11,1%) dos casos, não obtivemos dados a respeito de sua realização (Tabela 11).

**Tabela 10** - Frequência das variáveis de acordo com base de tratamento quimioterápico

| <b>Base da Quimioterapia</b> | <b>Frequência</b> | <b>(%)</b> |
|------------------------------|-------------------|------------|
| Citarabina alta dose         | 28                | 44,44      |
| Doxorrubicina                | 17                | 26,98      |
| Fludarabina                  | 7                 | 11,11      |
| Bortezomibe                  | 5                 | 7,93       |
| Outros                       | 4                 | 6,34       |
| Não avaliados                | 2                 | 3,17       |
| Total                        | 63                | 100        |

**Tabela 11** - Frequência das variáveis de acordo com uso de transplante autólogo em primeira remissão

| <b>TACTH- Consolidação</b> | <b>Frequência</b> | <b>(%)</b> |
|----------------------------|-------------------|------------|
| Sim                        | 23                | 36,50      |
| Não                        | 33                | 52,38      |
| Não identificados          | 7                 | 11,11      |
| Total                      | 63                | 100,0      |

Ao avaliarmos a resposta ao tratamento empregado, 34 (53,96%) pacientes obtiveram resposta completa ou resposta completa não confirmada enquanto 18 (28,57%) pacientes não atingiram esta resposta. Destes 18 pacientes, a resposta parcial foi conseguida em 8 (12,70%) , foi observada refratariedade em 5(7,93%) e progressão da doença em outros 5 (7,93%) casos. Em 11 pacientes não obtivemos dados que possibilitassem esta avaliação (Tabela 12)

**Tabela 12** - Frequências das variáveis de acordo com resposta ao tratamento quimioterápico

| <b>Resposta ao tratamento</b>    | <b>Frequência</b> | <b>(%)</b> |
|----------------------------------|-------------------|------------|
| Resposta Completa Confirmada     | 26                | 41,26      |
| Resposta Completa não Confirmada | 8                 | 12,70      |
| Resposta Parcial                 | 8                 | 12,70      |
| Refratário                       | 5                 | 7,93       |
| Progressão da doença             | 5                 | 7,93       |
| Não Avaliados                    | 11                | 17,46      |
| Total                            | 63                | 100        |

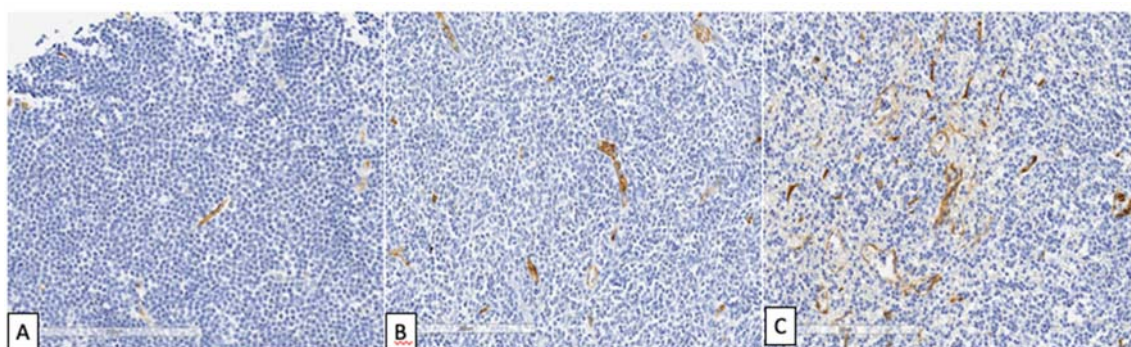
Com relação a avaliação histopatológica para definição do diagnóstico todos os pacientes apresentaram positividade para CD20, CD5 e ciclina-D1 e negatividade para CD23. (Figura 9) Não houve necessidade de realização de FISH para confirmação de diagnóstico em nenhum dos casos avaliados.

Para avaliação do grau de proliferação celular o valor de Ki-67 foi relatado em 55 pacientes. Foi do valor mínimo de 5%, máximo de 100%, mediana de 20%, desvio-padrão de 28,79 e média de 34,82%. Ao utilizarmos o valor de corte de 40%, 19(30,20%) pacientes apresentaram valor superior a 40% e 36(57,10%) pacientes valor igual ou inferior a 40%.

A avaliação de microdensidade vascular e capacidade de angiogênese foi realizada em 34 dos 63 pacientes (Figura 10). O uso de CD34 para quantificação de vasos/mm<sup>2</sup> mostrou resultado mínimo de 0 e valor máximo de 16 com mediana de 3,5, desvio padrão de 4,98 e média de 4,88 (Tabela 13 e Figura 11). A avaliação da capacidade de angiogênese através da positividade da reação imuno-histoquímica a VEGF mostrou-se inferior a 10% em 12 (35,29%) dos casos e igual ou acima de 10% em 22 (64,71%) (Tabela 14). Já a avaliação através da reação imuno-histoquímica a HIF- $\alpha$  mostrou-se inferior a 10% em 12 (35,29%) e igual ou acima de 10% em 22 (64,71%) dos casos (Tabela 14 e Figura 12).

**Tabela 13** - Frequência das variáveis de acordo com concentração de microdensidade vascular detectado por CD34

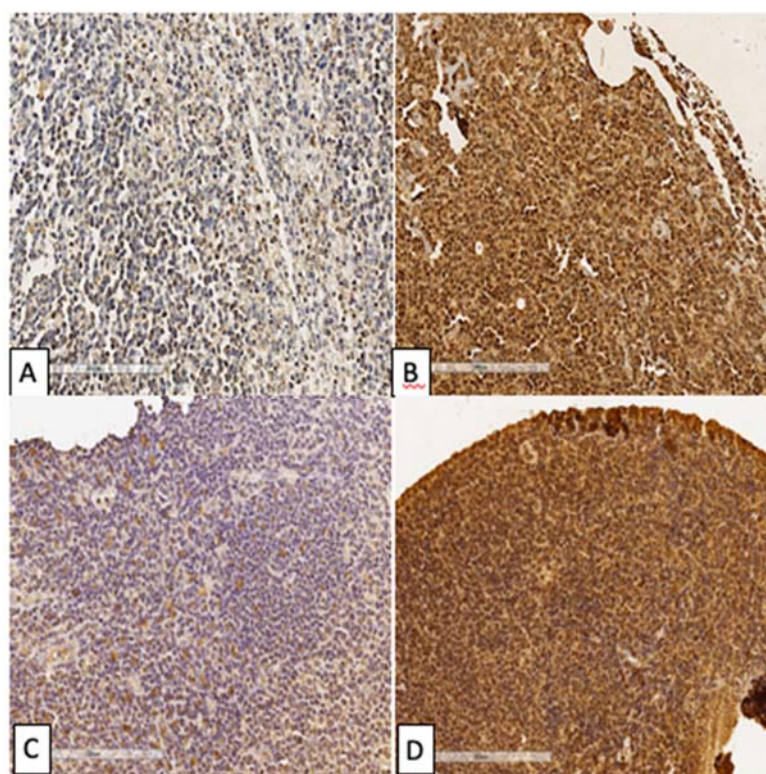
| Variável                       | N  | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo | Média |
|--------------------------------|----|---------------|---------|--------|--------|-------|
| CD34 (vasos/ mm <sup>2</sup> ) | 34 | 4,98          | 3,50    | 0      | 16     | 14,88 |



**Figura 11** – Microdensidade vascular em Linfoma de células do manto por CD34. A neoplasia costuma apresentar diferentes padrões de positividade quando avaliada a densidade microvascular por CD34: baixa quantidade (A); média quantidade (B); elevada quantidade(C). A contagem se dá com auxílio da gradícula para microscópio ótico e é expressa em vasos por mm<sup>2</sup>. Foto cedida pelo Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center

**Tabela 14** - Frequência das variáveis de acordo com concentração de microdensidade vascular detectado por VEGF e HIF- $\alpha$

| Variável      | N  | Categoria   | N  | (%)   |
|---------------|----|-------------|----|-------|
| VEGF          | 34 | <10%        | 12 | 35,29 |
|               |    | $\geq 10\%$ | 22 | 64,71 |
| HIF- $\alpha$ | 34 | <10%        | 12 | 35,29 |
|               |    | $\geq 10\%$ | 22 | 64,71 |



**Figura 12** - Linfoma de células do manto VEGF e HIF- $\alpha$ . A neoplasia costuma apresentar diferentes padrões de positividade quando avaliada a densidade microvascular por VEGF :baixa quantidade: <10% (A); alta quantidade:  $\geq 10\%$  (B). O mesmo se repete para HIF- $\alpha$  (C) e (D) respectivamente. Foto cedida pelo Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center

## 5.2 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL

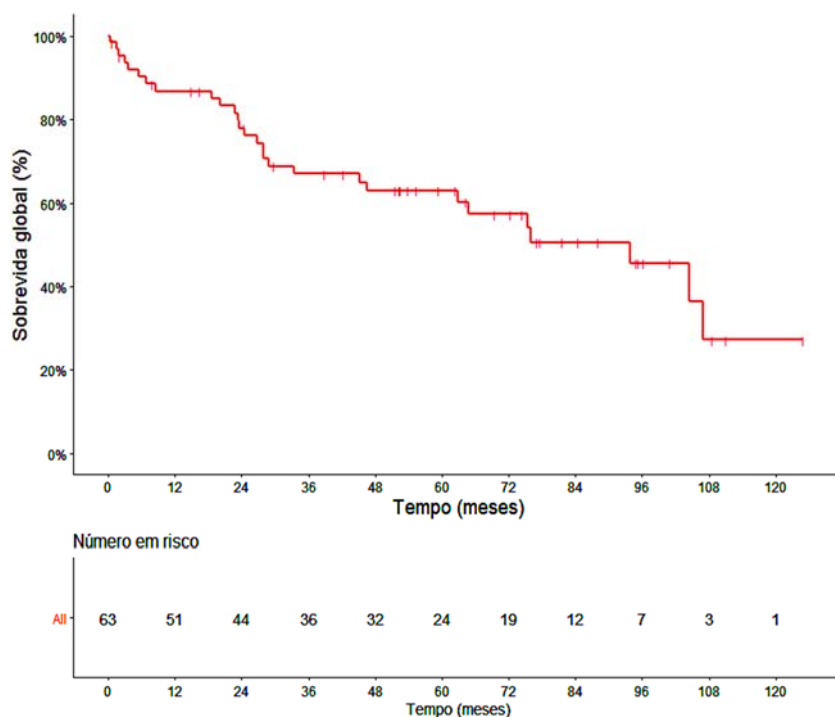
Para esta análise foram estudados os pacientes que apresentaram tempo decorrido entre o diagnóstico definido pela data do laudo da anatomia patológica até o último contato ou óbito por qualquer causa.

No caso de variáveis contínuas a determinação de dois grupos de observações com respeito a um simples ponto de corte foi estimada utilizando a proposta de Lausen e Schumacher

<sup>106</sup> que visa obter o melhor valor de ponto de corte com o objetivo de discriminar as curvas de sobrevivência. A estimativa do ponto de corte é obtida por meio da maximização da estatística *log-rank* padronizada e uma vez estimado o ponto de corte, a função de sobrevivência foi estimada utilizando o estimador de Kaplan-Meier e as comparações entre as curvas de sobrevivência foram avaliadas por meio do teste de *log-rank*.

A taxa de sobrevida global (SG) foi então determinada para os 63 pacientes admitidos de janeiro de 2006 a dezembro de 2014. Deste modo, obtivemos taxa de SG mediana de 93,91 meses com erro padrão de 15,90 meses e tempo de vida médio foi de 74,26 meses com erro padrão de 6,55 meses (Figura 13). A mediana de seguimento foi de 72, 34 meses com erro padrão de 8,71 e tempo médio de seguimento de 70,45 meses e erro padrão de 4,95 meses.

Além disso, o modelo de Cox simples foi ajustado com objetivo de avaliar os possíveis fatores de risco em que a medida de associação é dada por *Hazard-Ratio* (HR). Para tanto, analisamos o impacto das variáveis sexo, idade, estágio, presença de massa tumoral maior ou igual a 7,5 cm, presença de sintomas constitucionais, número de leucócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas ao diagnóstico na taxa de SG. Também avaliamos índices de prognóstico MIPI, MIPI biológico e seus correlatos simplificados, valor de Ki-67 além do tratamento empregado. Destes 63 pacientes, 34 foram avaliados para a quantificação da microdensidade vascular, de acordo com marcador imuno-histoquímico CD34, e para a angiogênese com os marcadores imuno-histoquímicos VEGF e HIF- $\alpha$ .

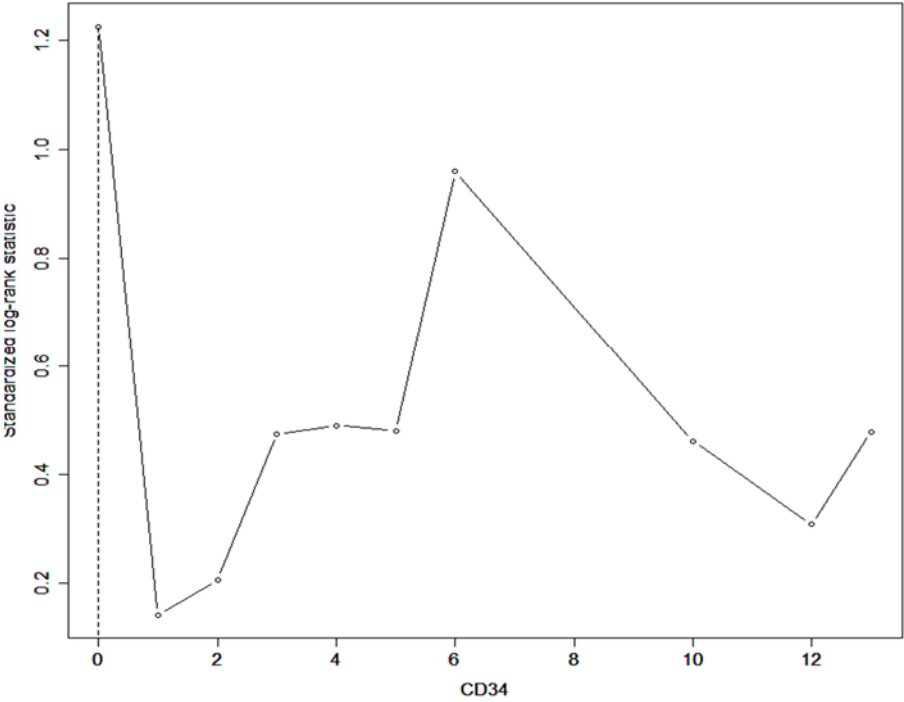


**Figura 13** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014

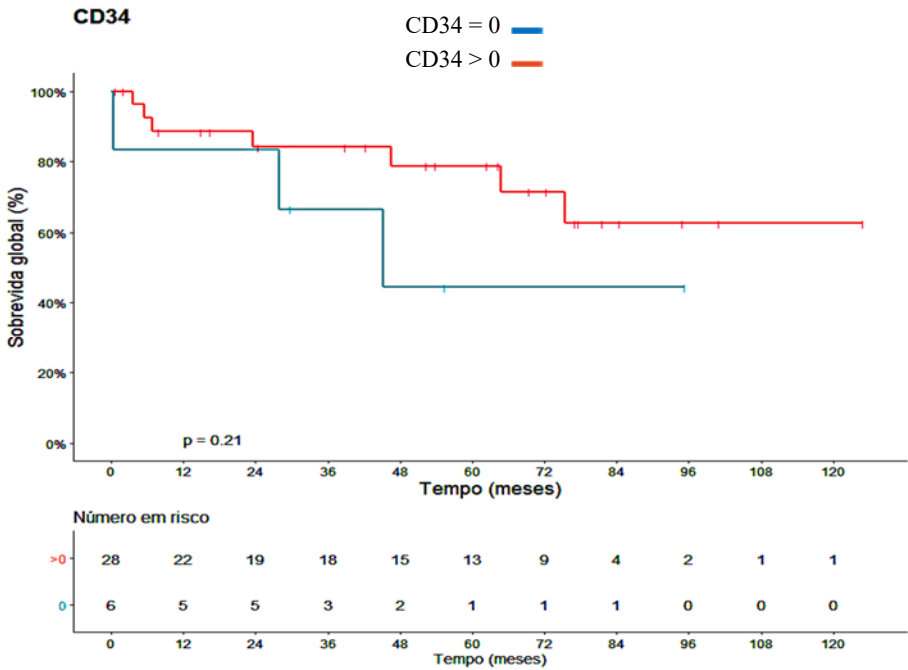
### 5.2.1 Análise de sobrevida global de acordo com microdensidade vascular (MDV) e variáveis de angiogênese

A reação por imunohistoquímica para avaliação da microdensidade vascular (MDV) e angiogênese foi realizada em 34 dos 63 pacientes.

Por meio da Figura 13 é possível observar uma estimativa do melhor ponto de corte para a contagem de vasos através da marcação com CD34. Todavia, a avaliação da MDV por CD34 não mostrou significância estatística mesmo quando separamos os casos entre aqueles que se mostraram ausentes e os que apresentaram algum grau de aumento de MDV ( $p=0,21$ ) (Figuras 14 e 15).

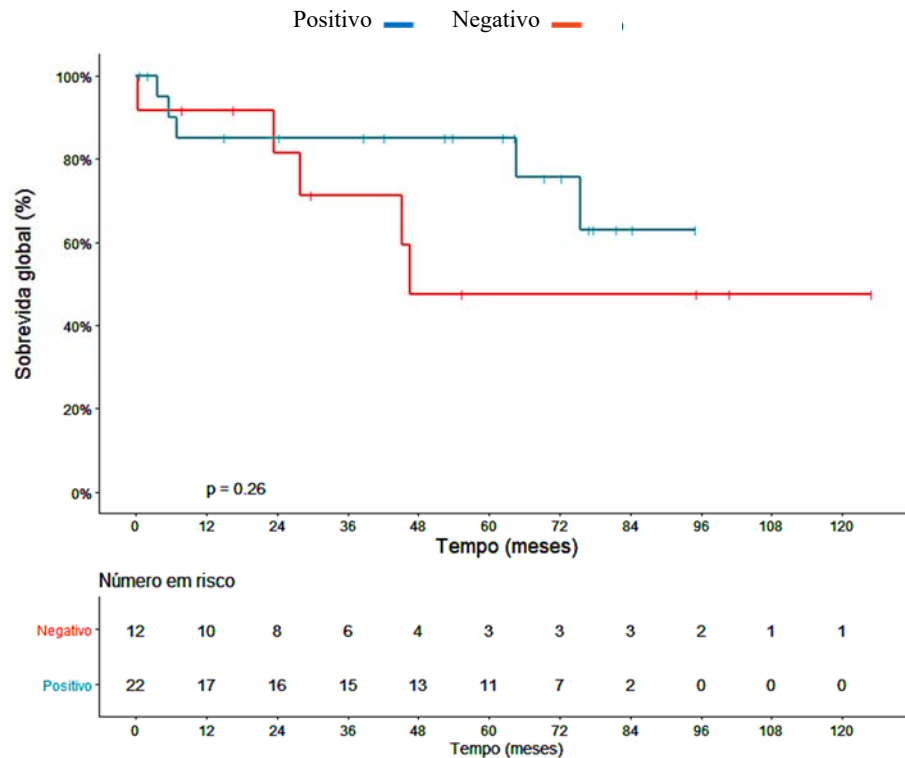


**Figura 14** - Estimativa do ponto de corte de acordo com MDV obtido por CD34 em relação à Sobrevida Global

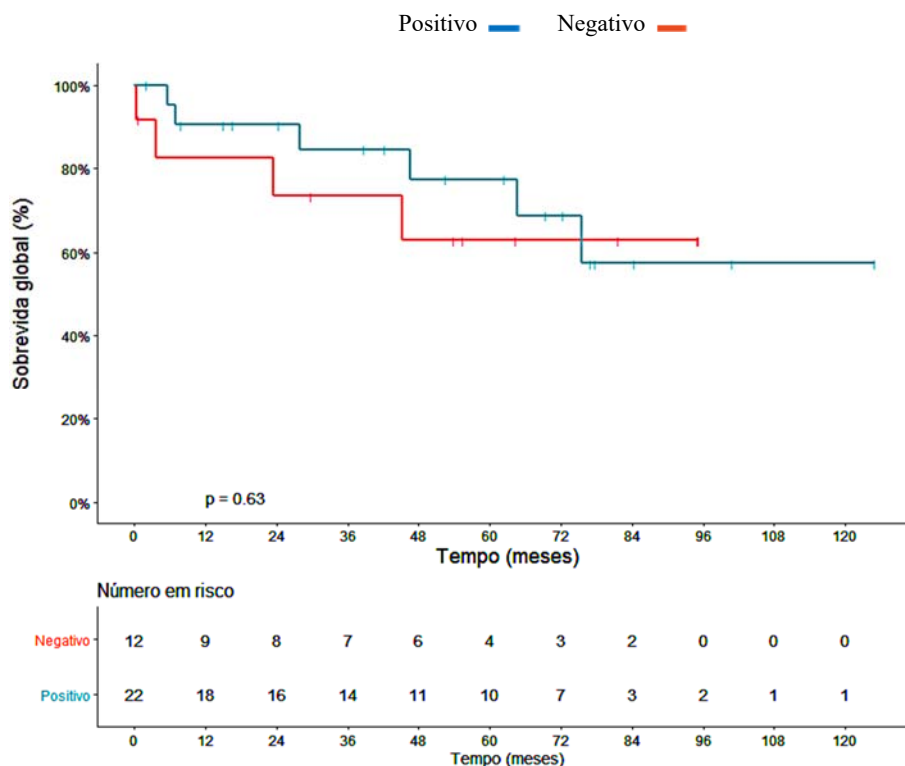


**Figura 15** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com MDV definido por reação imunohistoquímica a CD34

Avaliamos a angiogênese de acordo com valores que consideramos negativos quando inferiores a 10% ou positivos quando de pelo menos 10 % tanto para VEGF como para HIF- $\alpha$ . Em nenhuma das avaliações obtivemos significância estatística ( $p=0,26$  e  $p=0,63$ , respectivamente) (Figuras 16 e 17).



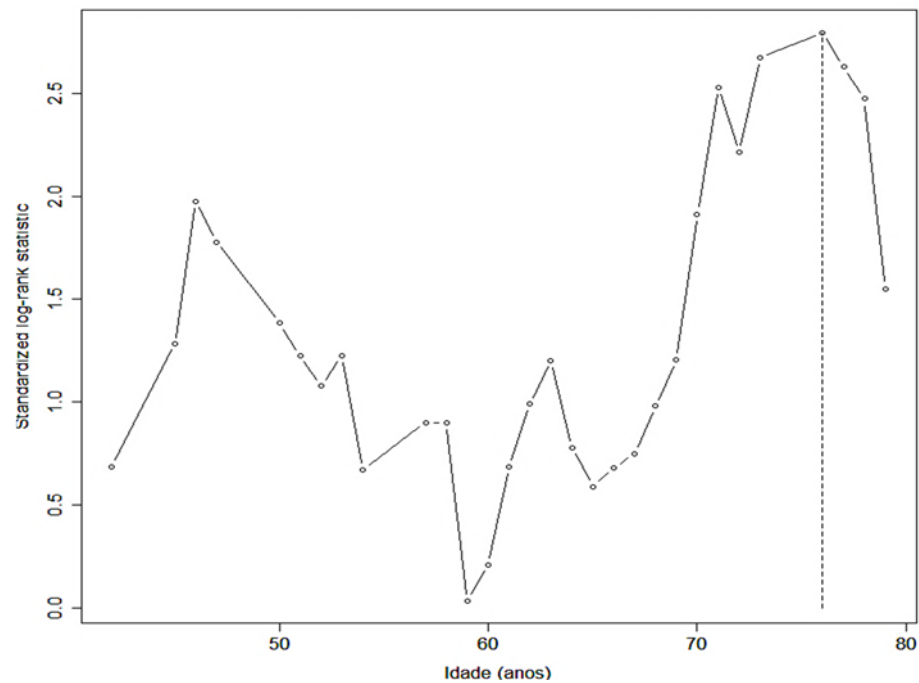
**Figura 16** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com angiogênese definido por reação imuno-histoquímica a VEGF  $< 10\%$  (Negativo) ou  $\geq 10\%$  (Positivo)



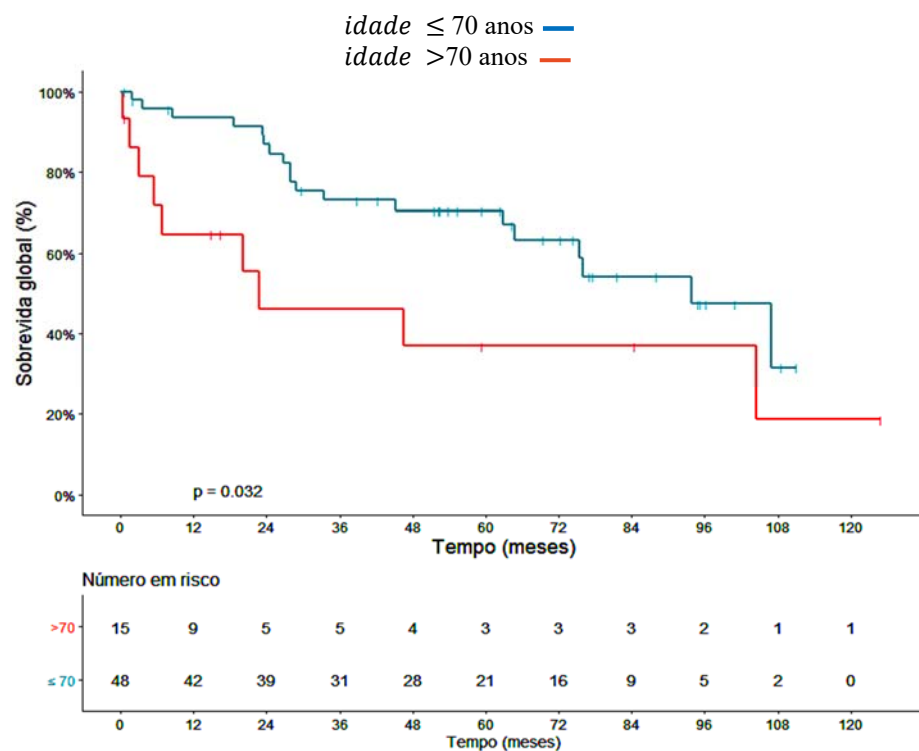
**Figura 17** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com angiogênese definido por reação imuno-histoquímica a HIF- $\alpha$   $< 10\%$  (Negativo) ou  $\geq 10\%$  (Positivo)

### 5.2.2 Análise de sobrevida global de acordo com variáveis de dados clínicos e demográficos

Por meio da Figura 18 é possível observar uma estimativa do melhor ponto de corte para idade ao diagnóstico. Na Figura 19 observamos uma divergência entre as curvas sinalizando uma diferença com significância estatística entre elas ( $p=0,032$ ) e demonstrando uma menor sobrevida global em pacientes com idade ao diagnóstico superior a 70 anos associado ao teste de *log-rank*.



**Figura 18** - Estimativa do ponto de corte para idade ao diagnóstico em relação à sobrevida global



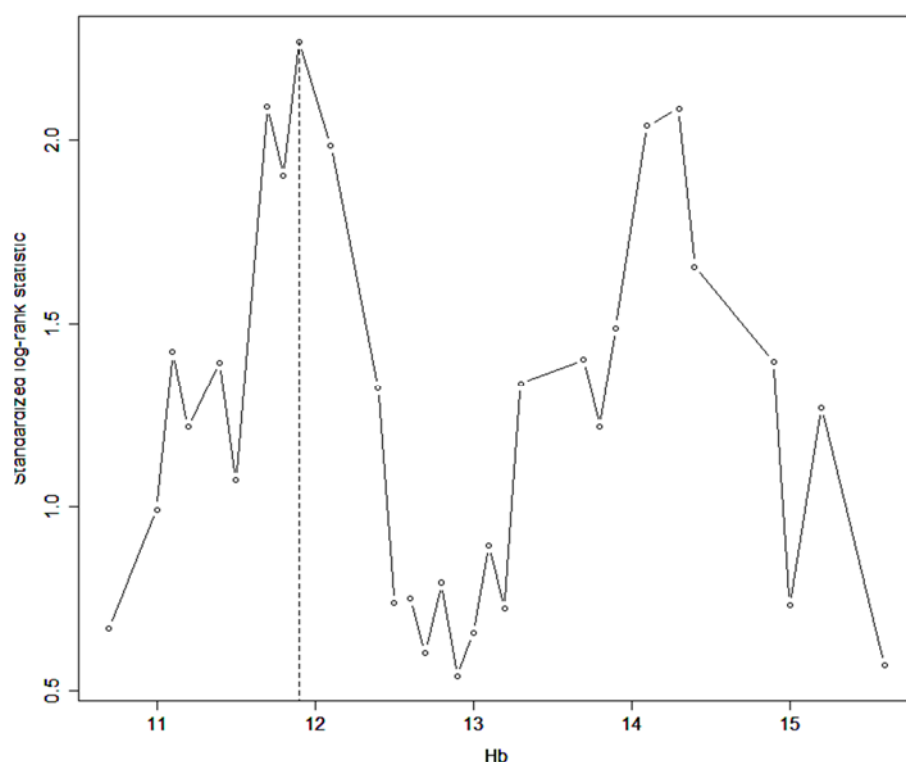
**Figura 19** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com idade  $\leq 70$  anos ou  $> 70$  anos.

Para os dados referentes a gênero, presença de massa volumosa igual ou maior que 7,5 cm, estágio de acordo com Ann Arbor, presença de sintomas sistêmicos, comprometimento do baço ou comprometimento extranodal não obtivemos significância estatística.

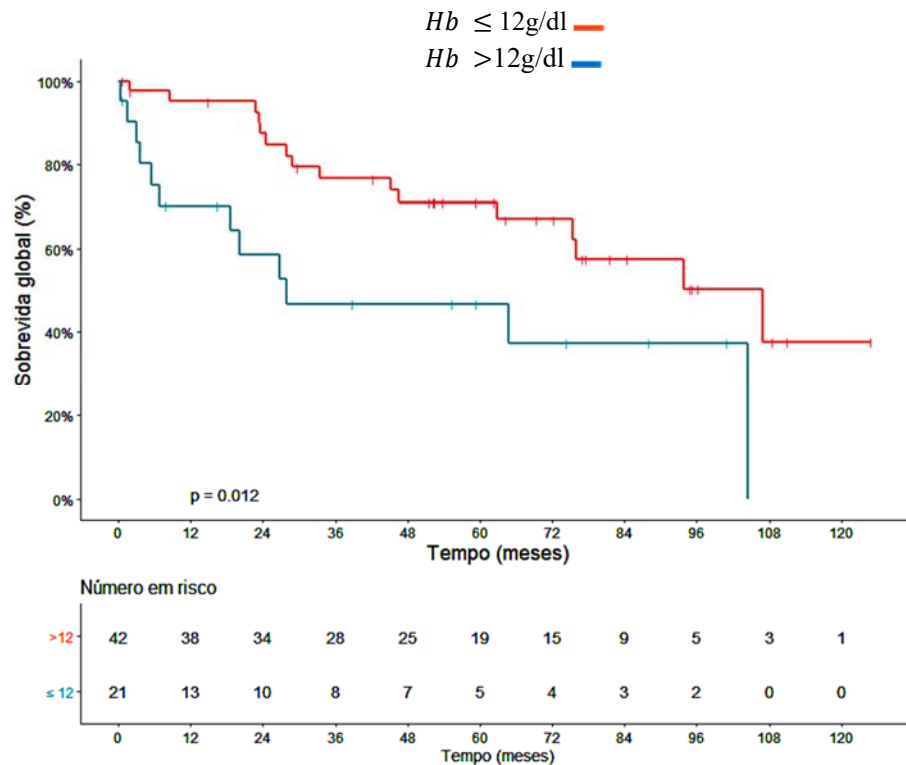
### 5.2.3 Análise de sobrevida global de acordo com variáveis de dados laboratoriais

Por outro lado, dados referentes a concentração de hemoglobina, número de leucócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas mostraram significância estatística.

Definimos o ponto de corte a partir do qual foi possível demonstrar significância estatística ao distribuímos os pacientes entre valores até 12g/dl ou superiores a 12 g/dl com  $p=0,012$ . (Figuras 20 e 21)

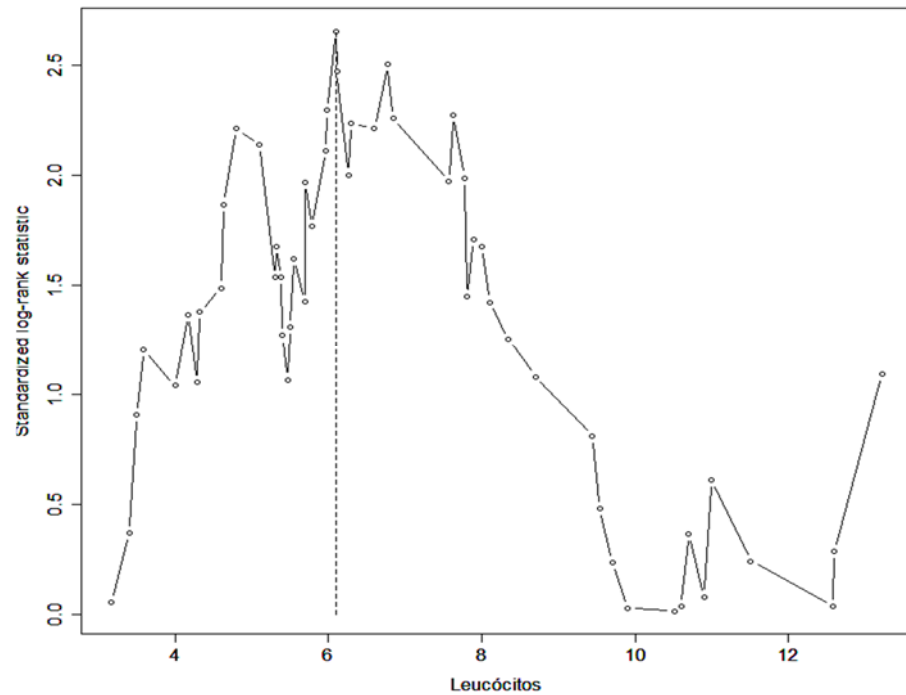


**Figura 20** - Estimativa do ponto de corte para concentração de hemoglobina ao diagnóstico em relação à sobrevida global

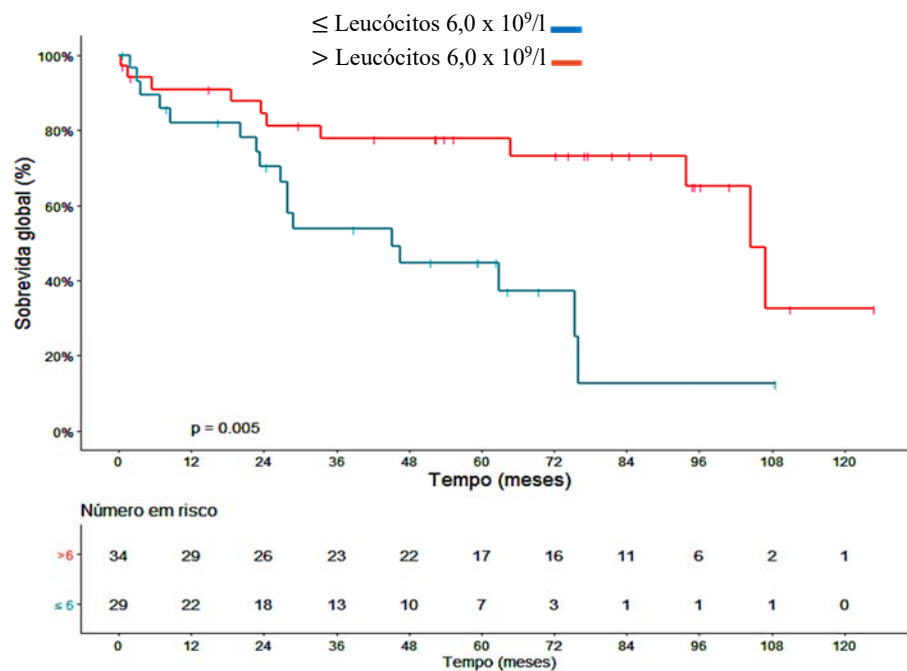


**Figura 21-** Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com *cut-off* de concentração de Hemoglobina  $\leq 12\text{g/dl}$  ou  $> 12\text{g/dl}$

No que tange ao número de leucócitos a significância estatística foi obtida ao distribuímos os pacientes entre valores até  $6,0 \times 10^9/\text{l}$  ou superiores a  $6,0 \times 10^9/\text{l}$  com  $p = 0,005$  (Figuras 22e 23).

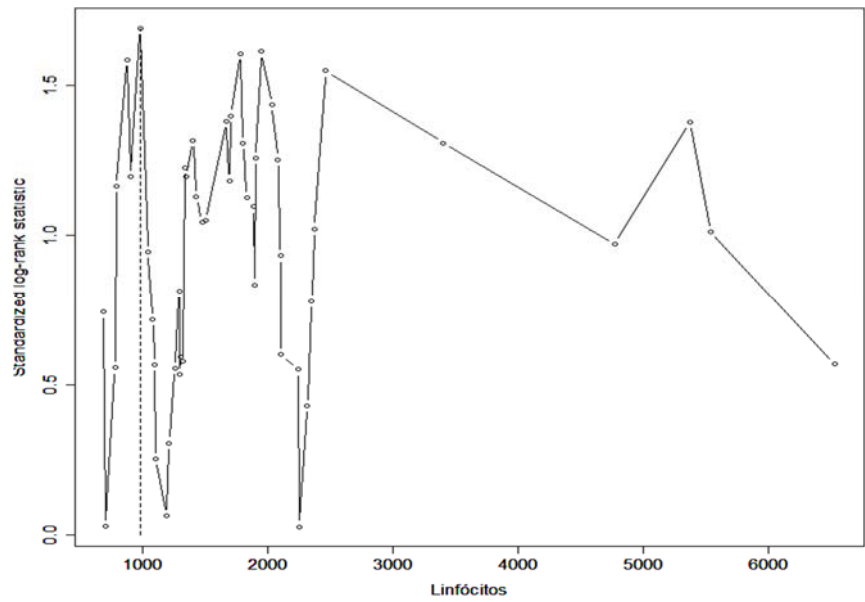


**Figura 22** - Estimativa do ponto de corte de acordo com o número de leucócitos ao diagnóstico em relação à sobrevida global

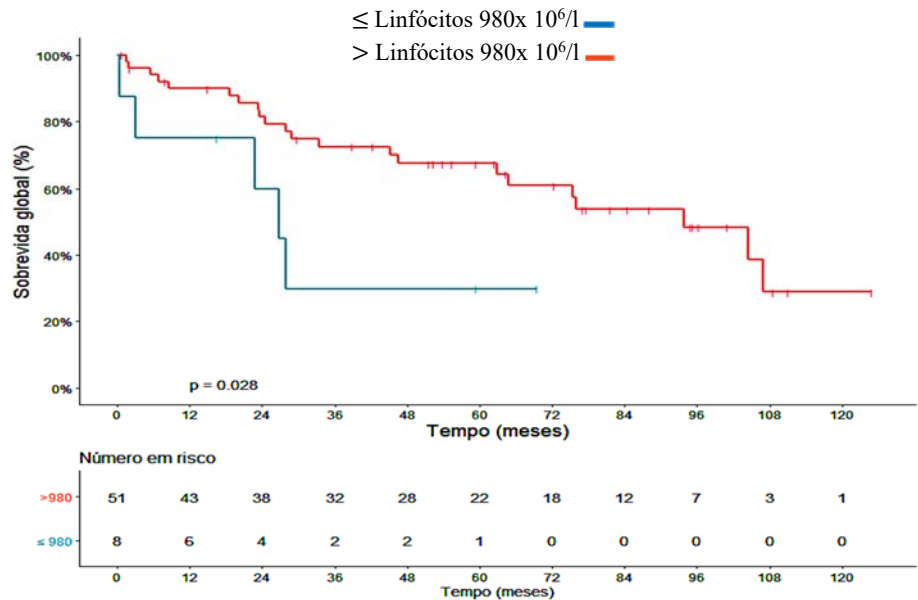


**Figura 23** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com *cut-off* de número de leucócitos  $\leq 6,0 \times 10^9/l$  ou  $> 6 \times 10^9/l$

Quando consideramos o número de linfócitos, a significância estatística foi obtida ao distribuirmos os pacientes entre valores até  $980 \times 10^6/l$  ou superiores a  $980 \times 10^6/l$  com  $p= 0,028$ . (Figuras 24 e 25).

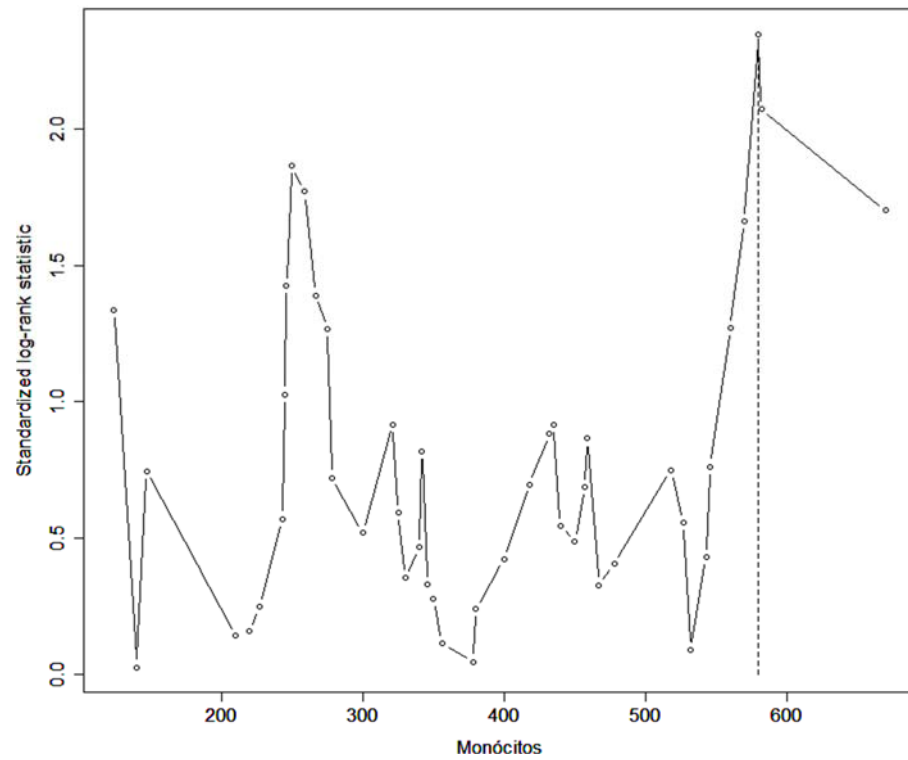


**Figura 24** - Estimativa do ponto de corte de acordo com o número de linfócitos ao diagnóstico em relação à sobrevida global

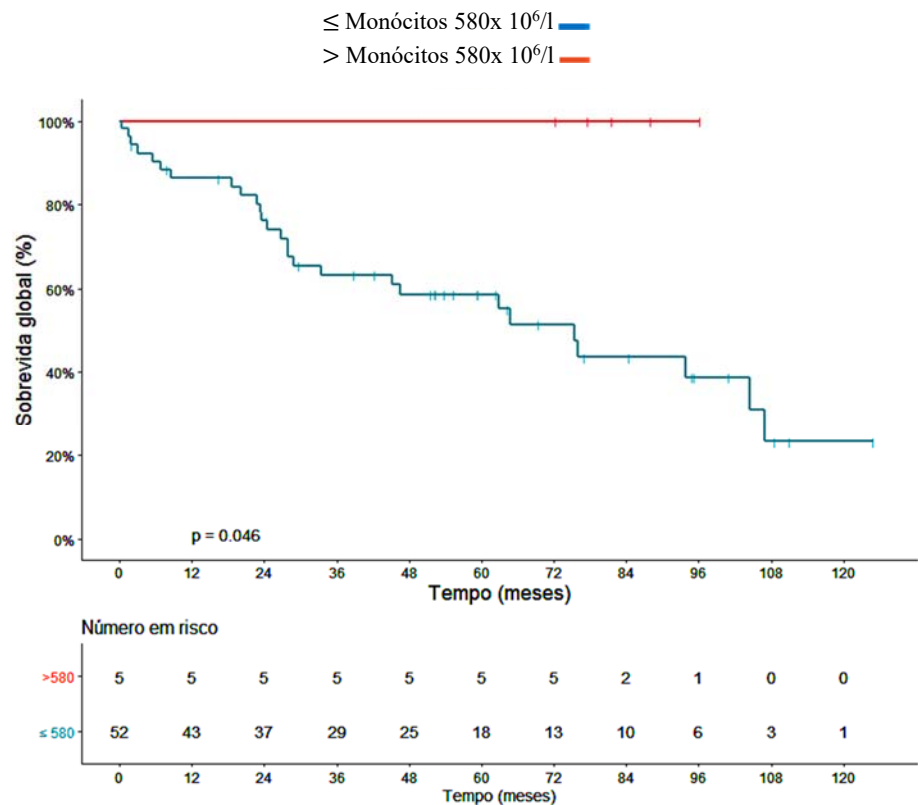


**Figura 25** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com *cut-off* de número de linfócitos  $\leq 980 \times 10^6/l$  ou  $> 980 \times 10^6/l$

Ao levarmos em conta o número de monócitos a significância estatística foi obtida ao distribuirmos os pacientes entre valores até  $580 \times 10^6/l$  ou superiores a  $580 \times 10^6/l$  com  $p=0,046$  (Figuras 26 e 27).

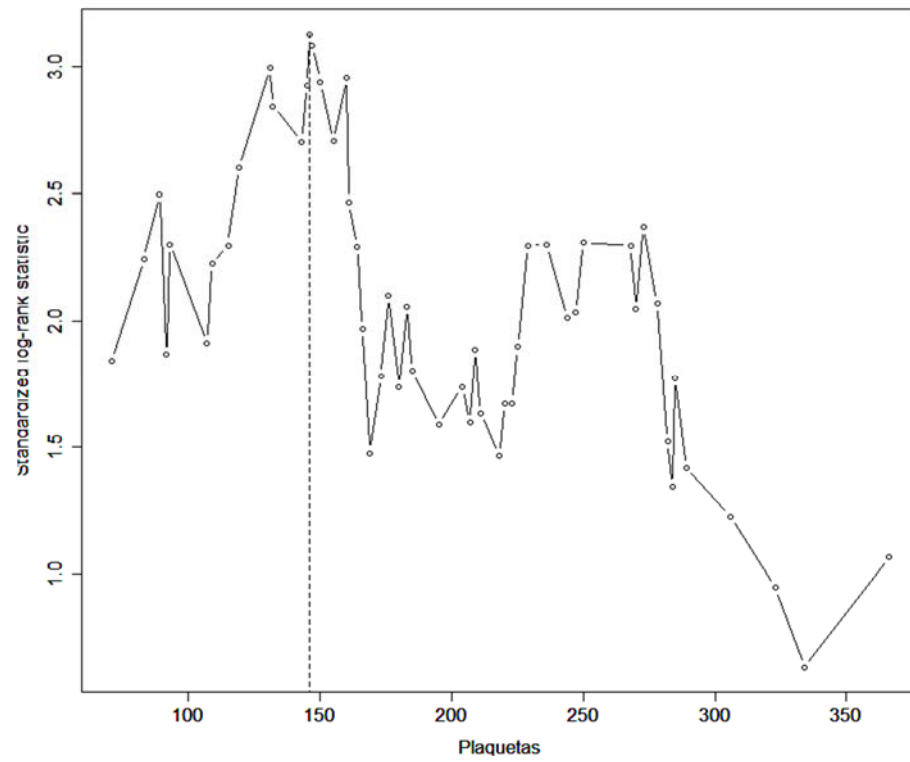


**Figura 26** - Estimativa do ponto de corte de acordo com o número de monócitos ao diagnóstico em relação à sobrevida global

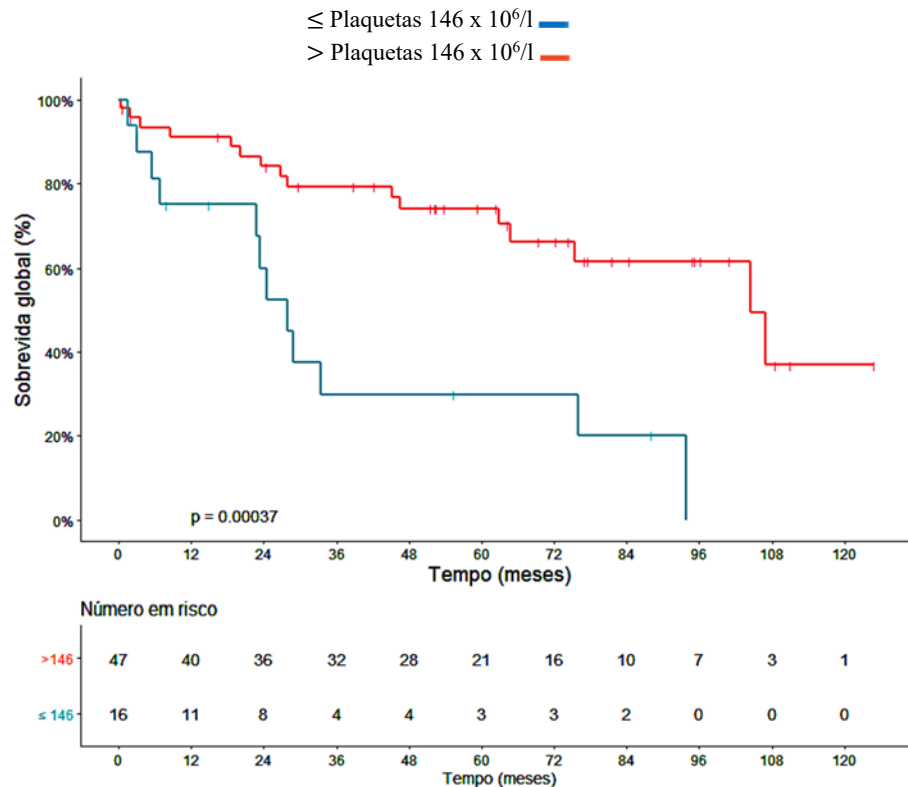


**Figura 27** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo *cut-off* de número de monócitos  $\leq 580 \times 10^6/l$  ou  $> 580 \times 10^6/l$ .

Com relação ao número de plaquetas a significância estatística foi obtida ao distribuimos os pacientes entre valores até  $146 \times 10^6/l$  ou superiores a  $146 \times 10^6/l$  com  $p < 0,001$  (Figuras 28 e 29).



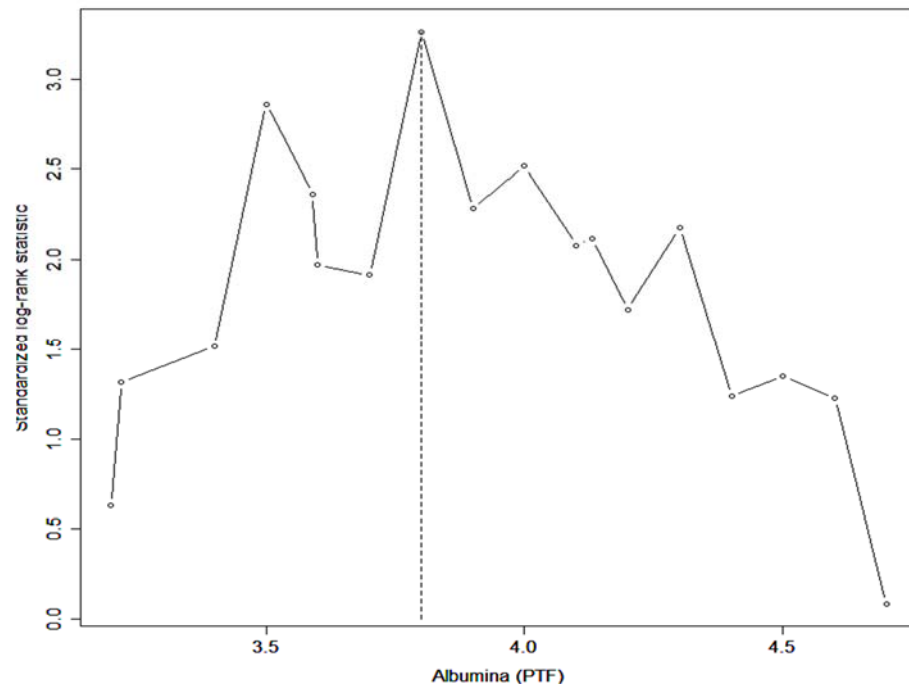
**Figura 28** - Estimativa do ponto de corte de acordo com o número de plaquetas ao diagnóstico em relação à sobrevida global



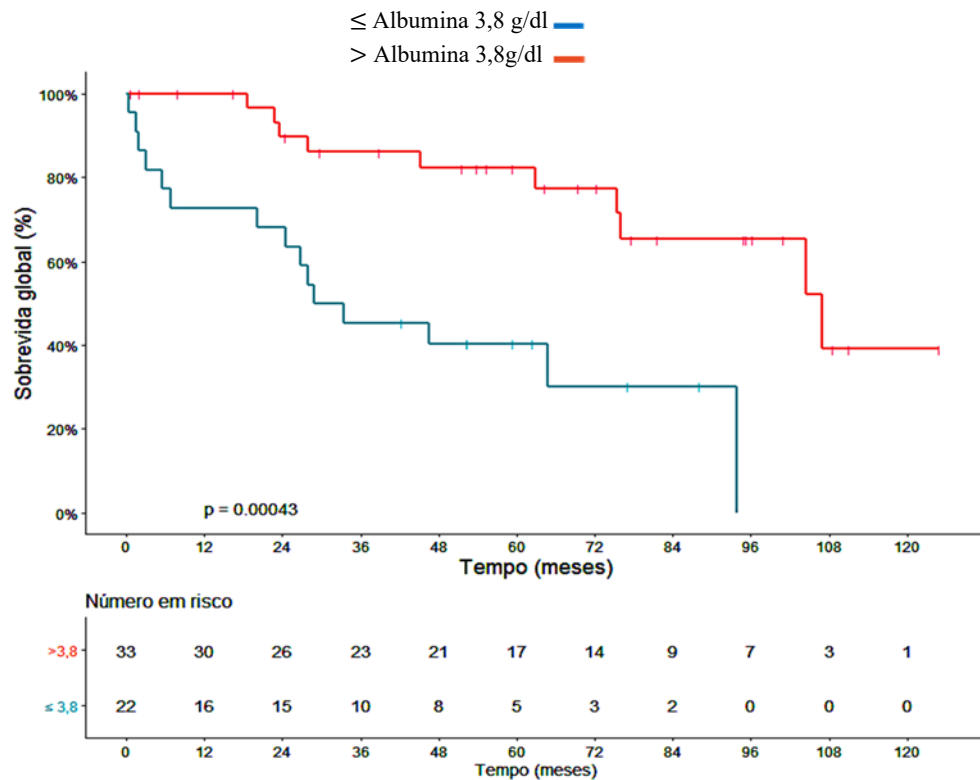
**Figura 29** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de Janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com *cut-off* de número de plaquetas  $\leq 146 \times 10^6/l$  ou  $> 146 \times 10^6/l$

Dados referentes a concentração de albumina e DHL também mostraram significância estatística.

A concentração de albumina mostrou significância estatística ao distribuirmos os pacientes entre valores até 3,8 g/dl ou superiores a 3,8 g/dl com  $p < 0,001$  (Figuras 30 e 31).

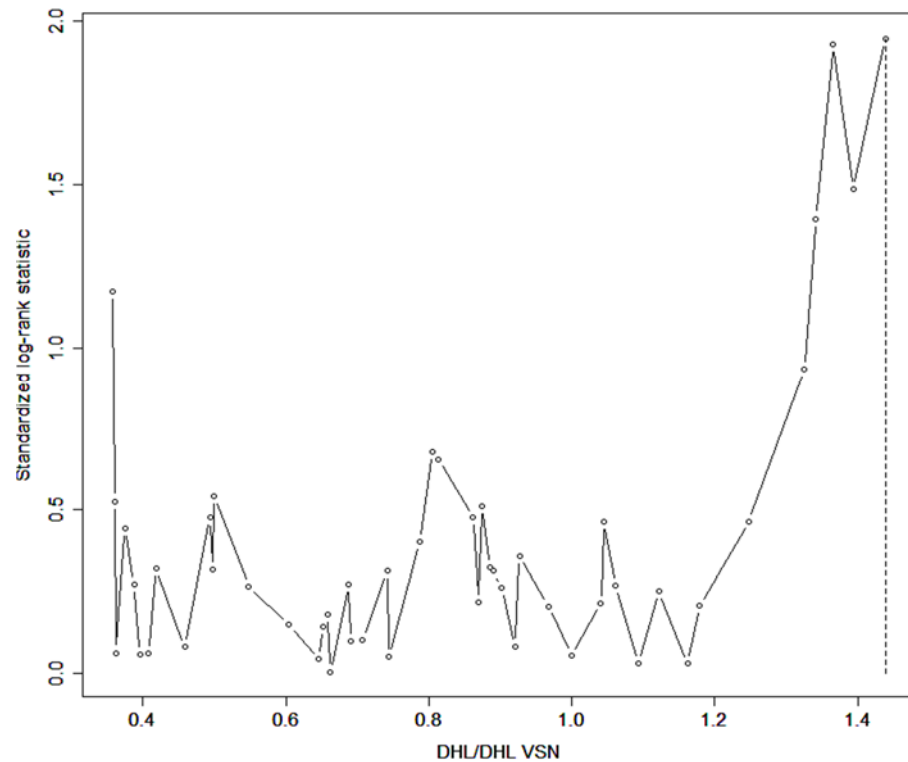


**Figura 30** - Estimativa do ponto de corte de acordo com a concentração de albumina ao diagnóstico em relação à sobrevida global

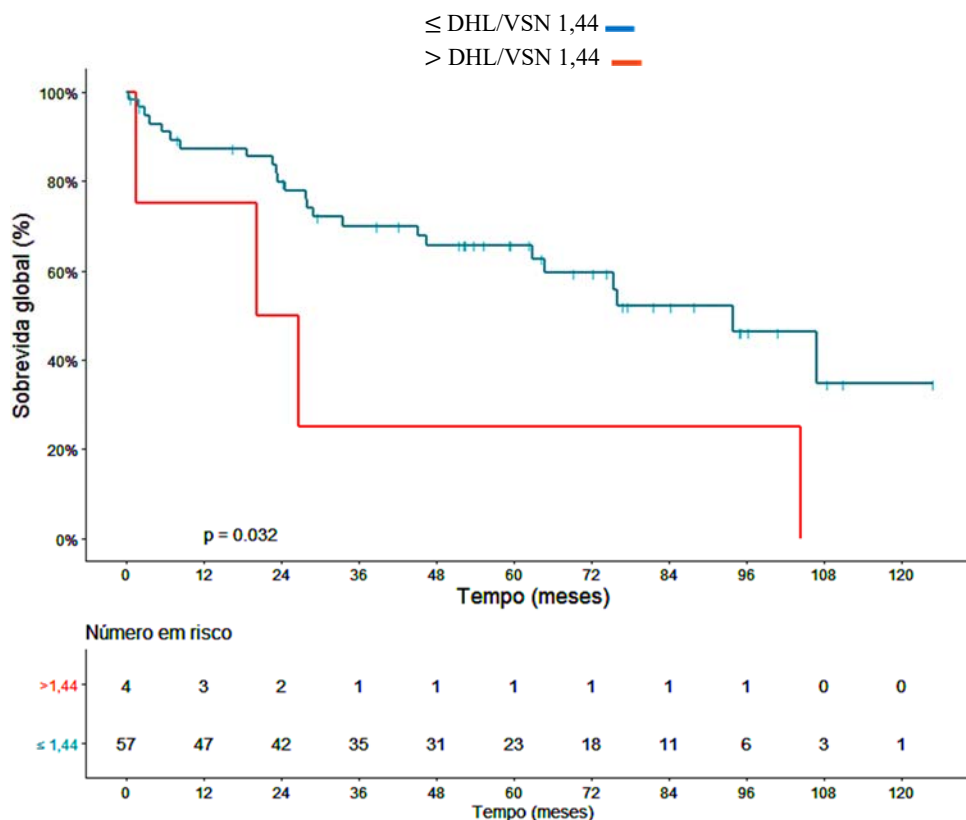


**Figura 31** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com *cut-off* de concentração de albumina  $\leq 3,8\text{g/l}$  ou  $> 3,8\text{g/l}$

No que tange ao DHL, devido a presença de 2 métodos distintos com diferentes faixas de normalidade, avaliamos a relação entre o valor obtido e o valor superior de normalidade do método empregado. Neste sentido, houve significância estatística ao dividirmos os pacientes entre resultados razão até 1,44 ou superior a ele com  $p=0,032$  (Figuras 32 e 33).



**Figura 32-** Estimativa do ponto de corte de acordo com a razão entre o valor obtido de DHL e seu respectivo valor máximo da faixa de normalidade ao diagnóstico em relação à sobrevida global

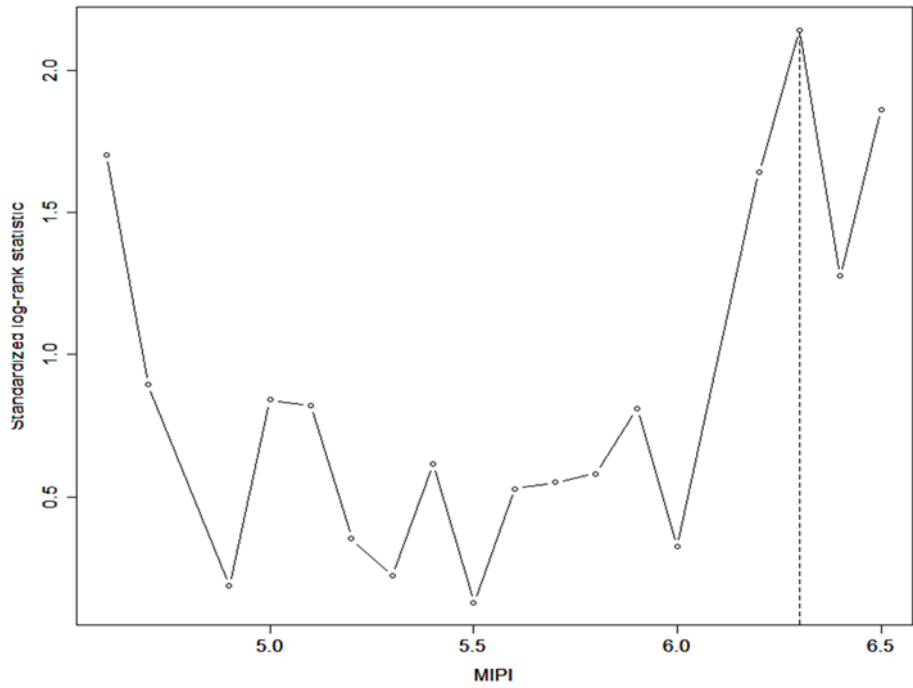


**Figura 33-** Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo *cut-off* de 1,44 de acordo com a razão entre o valor obtido de DHL e seu respectivo valor máximo da faixa de normalidade ao diagnóstico.

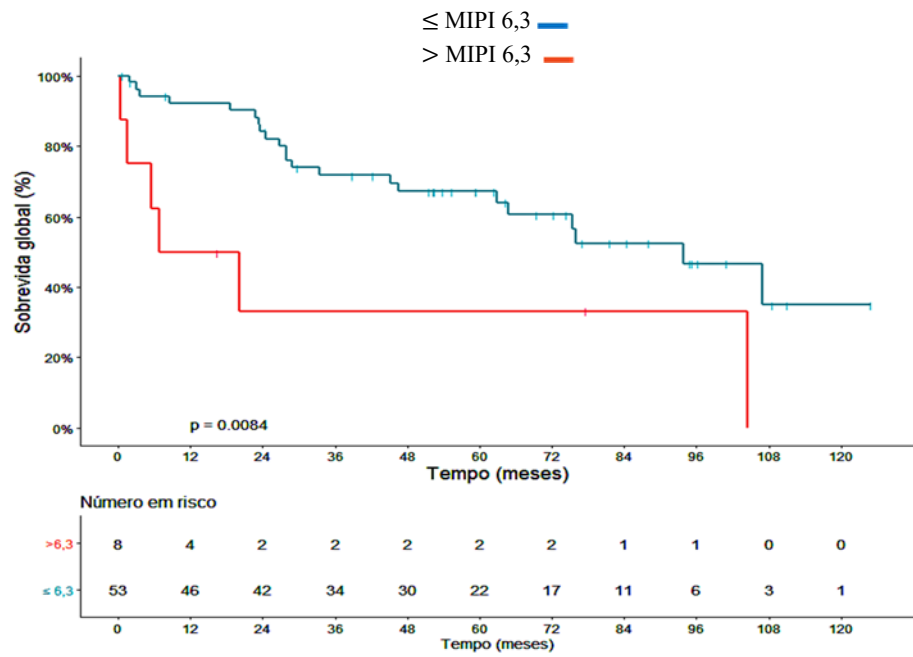
#### 5.2.4 Análise de sobrevida global de acordo com variáveis de índices prognósticos

A análise de sobrevida global de acordo com índices prognósticos levou em conta MIPI, MIPI-b e seus respectivos MIPI e MIPI-b simplificado, o valor de proliferação celular obtido por Ki-67 e a presença da hiperexpressão da proteína p53.

Ao avaliarmos índices prognóstico MIPI e MIPI-b, obtivemos dados com significância estatística. No caso do primeiro, esta significância foi conseguida ao distribuirmos os pacientes entre valores até 6,3 ou superiores a 6,3 com  $p = 0,0084$  (Figuras 34 e 35).

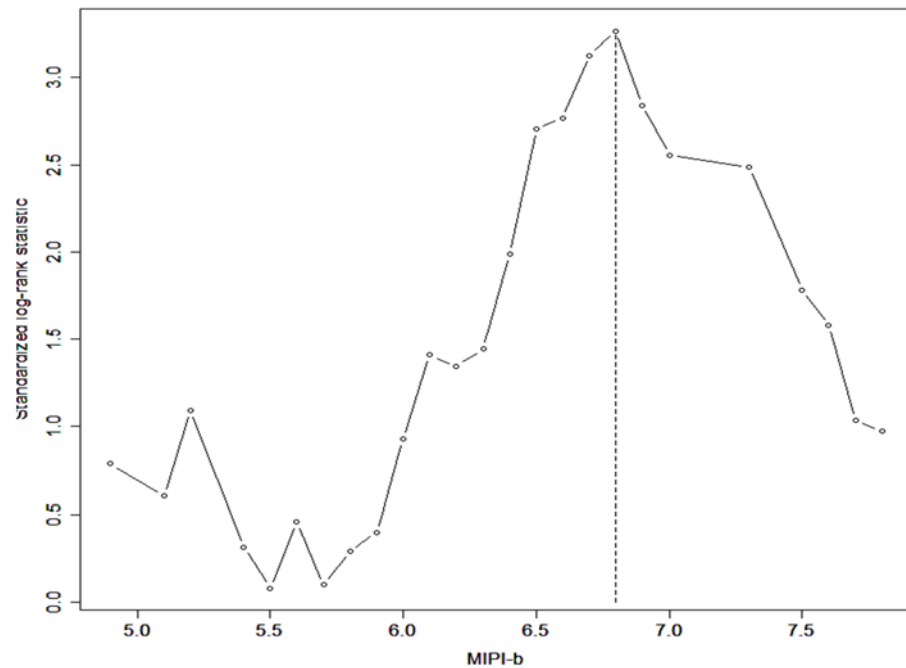


**Figura 34** - Estimativa do ponto de corte de acordo com o valor de MIPI ao diagnóstico em relação à sobrevida global

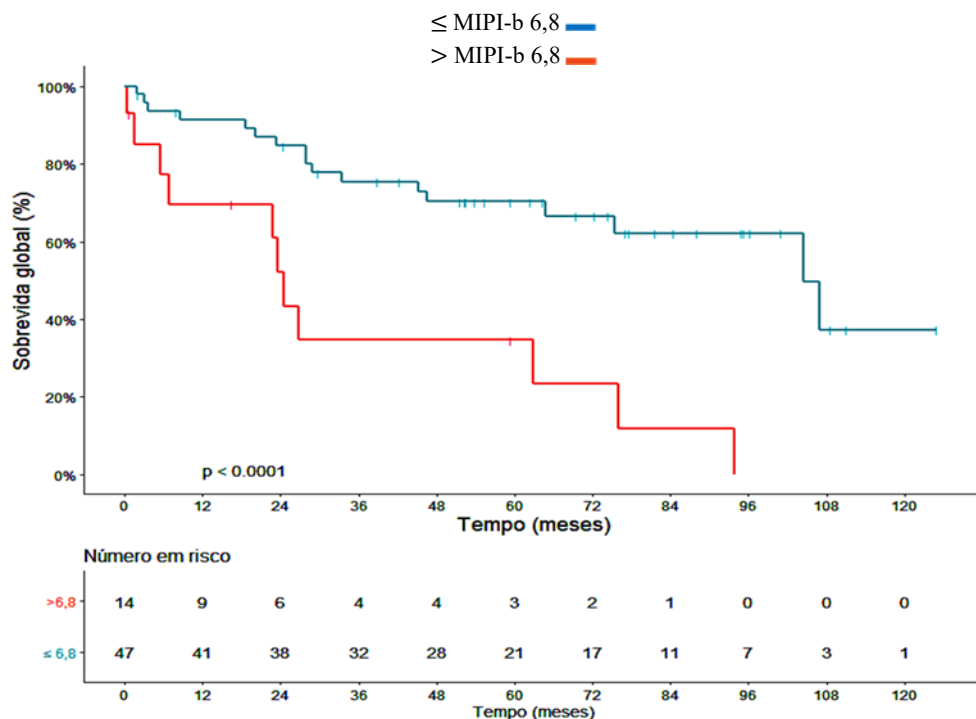


**Figura 35** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo *cut-off* de MIPI  $\leq 6,3$  ou  $> 6,3$ .

No caso do MIPI-b esta significância foi conseguida ao distribuimos os pacientes entre valores até 6,8 ou superiores a 6,8 com  $p < 0,001$  (Figuras 36 e 37).

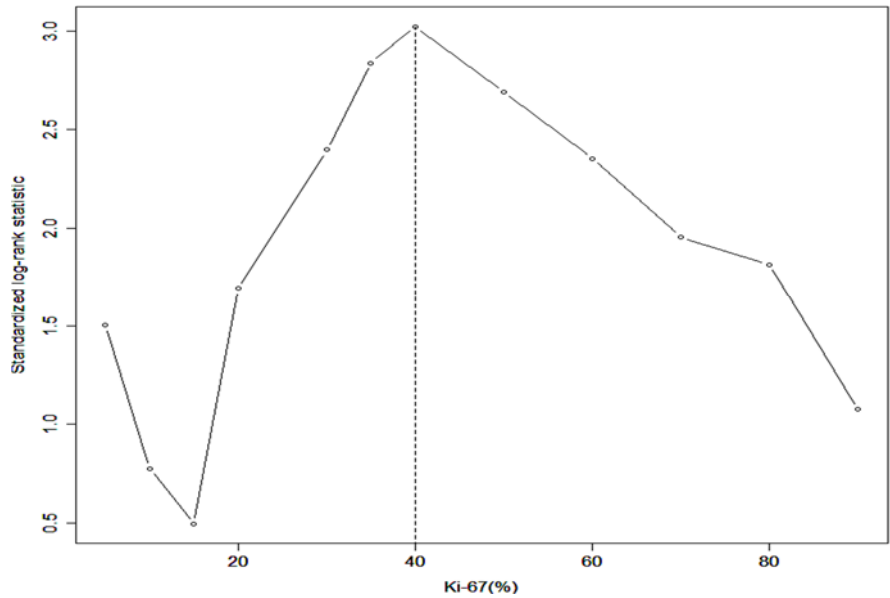


**Figura 36** - Estimativa do ponto de corte de acordo com o valor de MIPI-b em relação à sobrevida global

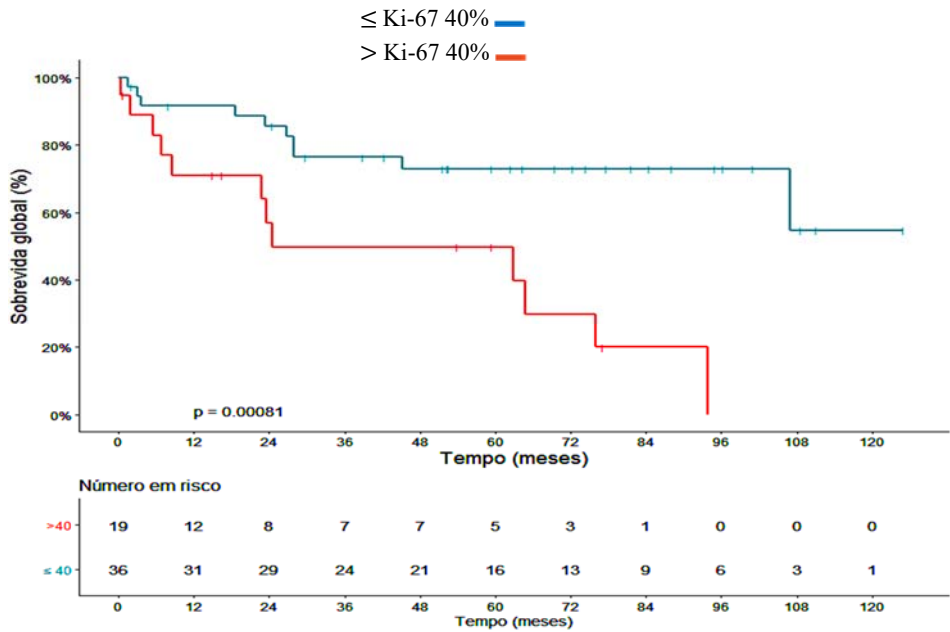


**Figura 37** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo *cut-off* de 6,8 de MIPI-b  $\leq 6,8$  ou MIPI-b  $> 6,8$

A avaliação de resultados obtidos pelos estudos imuno-histoquímicos para Ki-67 foi conseguida em 55 das 63 amostras e foi observada significância estatística ao distribuirmos os pacientes entre valores até 40% ou superiores a 40% com  $p= 0,00081$  (Figuras 38 e 39).

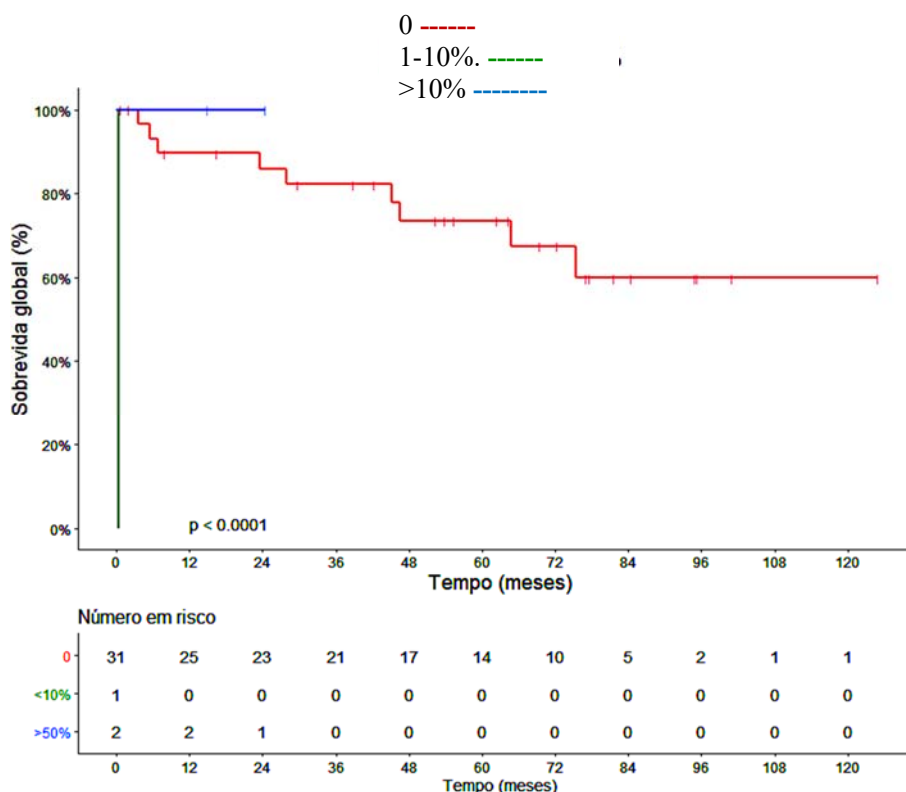


**Figura 38** - Estimativa do ponto de corte de acordo com o valor de Ki-67 em relação à sobrevida global



**Figura 39** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo *cut-off* de Ki-67  $\leq 40\%$  ou Ki-67  $> 40\%$

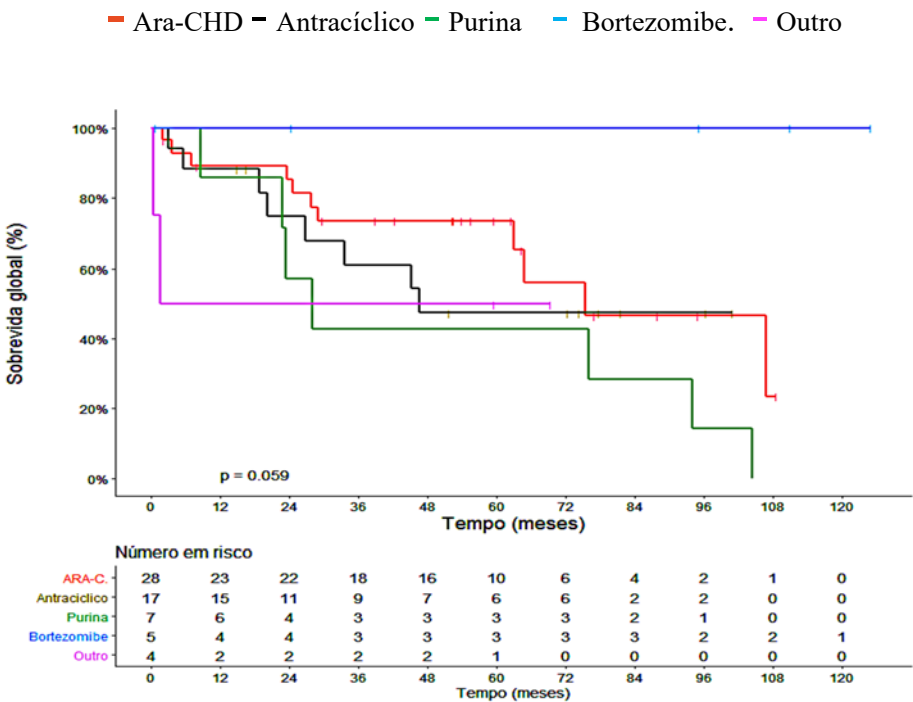
A avaliação de resultados obtidos pelos estudos imuno-histoquímicos para p53 foi obtido em 34 das 63 amostras e não foi observada significância estatística ao distribuímos os pacientes entre valores entre negativo (31 pacientes), entre 1 e 10% (1 paciente), entre 10 e 50% (0 pacientes) e acima de 50% (2 pacientes). Todavia, devido ao baixo número de participantes nos grupos positivos em qualquer valor para p53, este resultado deve ser observado com alguma restrição (Figura 40).



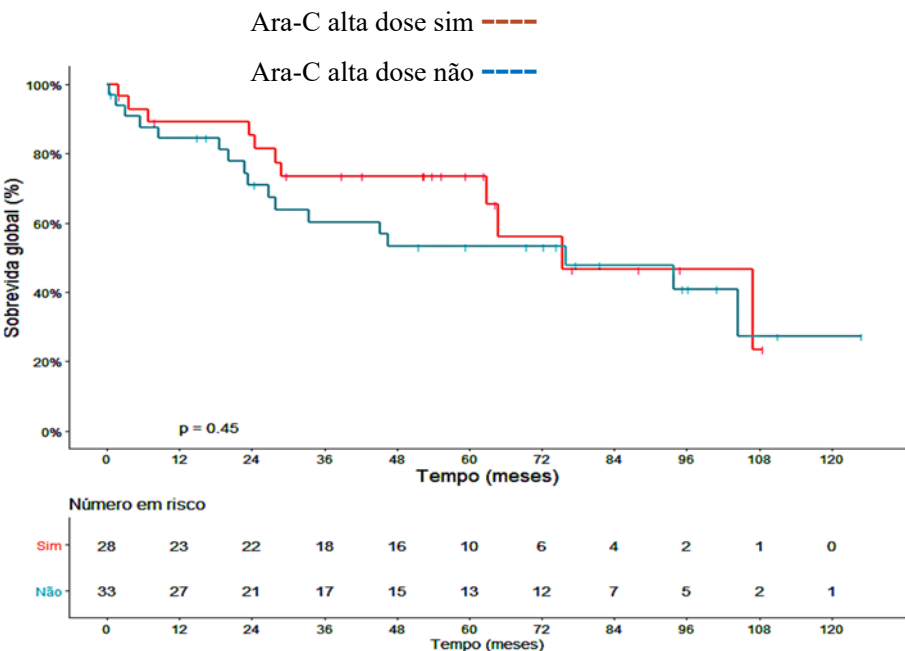
**Figura 40** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 34 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo valor obtido de p53 entre 0, < 10% e > 50%

### 5.2.5 Análise de Sobrevida Global de acordo com variáveis de tratamento

Com relação ao tratamento, não foi obtida significância estatística com relação a base do tratamento quimioterápico empregado. No entanto, como o grupo bortezomibe e o grupo “outros” apresentam pequeno número de participantes, este resultado deve ser encarado com cautela. Todavia, esta significância também não foi obtida mesmo ao separar os pacientes entre aqueles que receberam citarabina em dose alta e aqueles em que esta medicação não foi utilizada ( $p=0,45$ ) (Figuras 41 e 42)

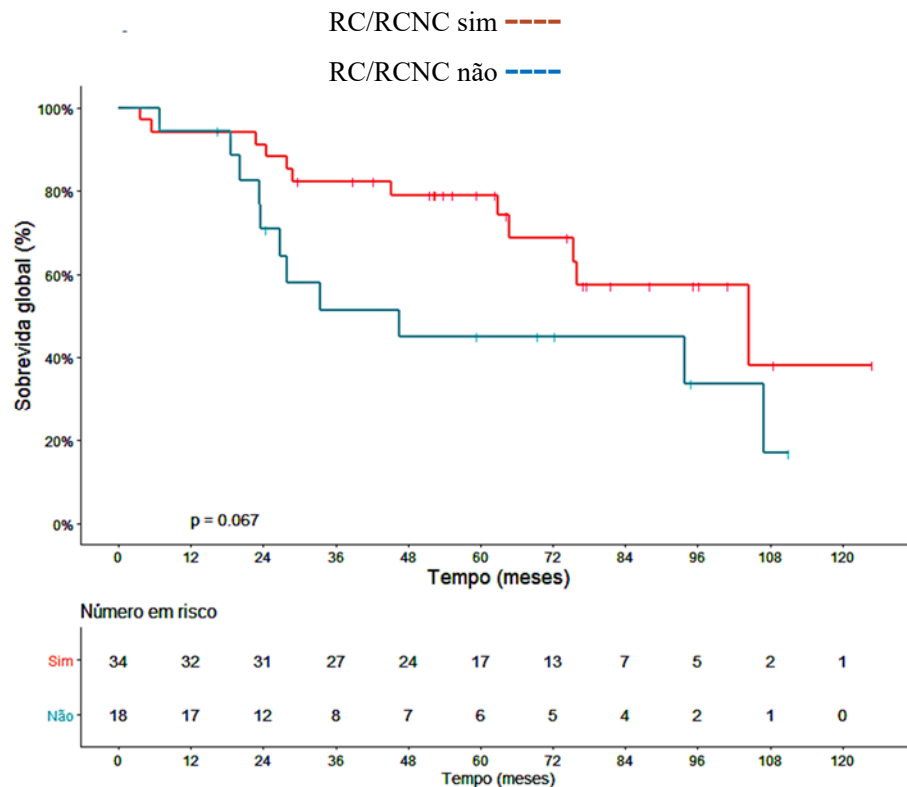


**Figura 41** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com a base de quimioterapia administrada

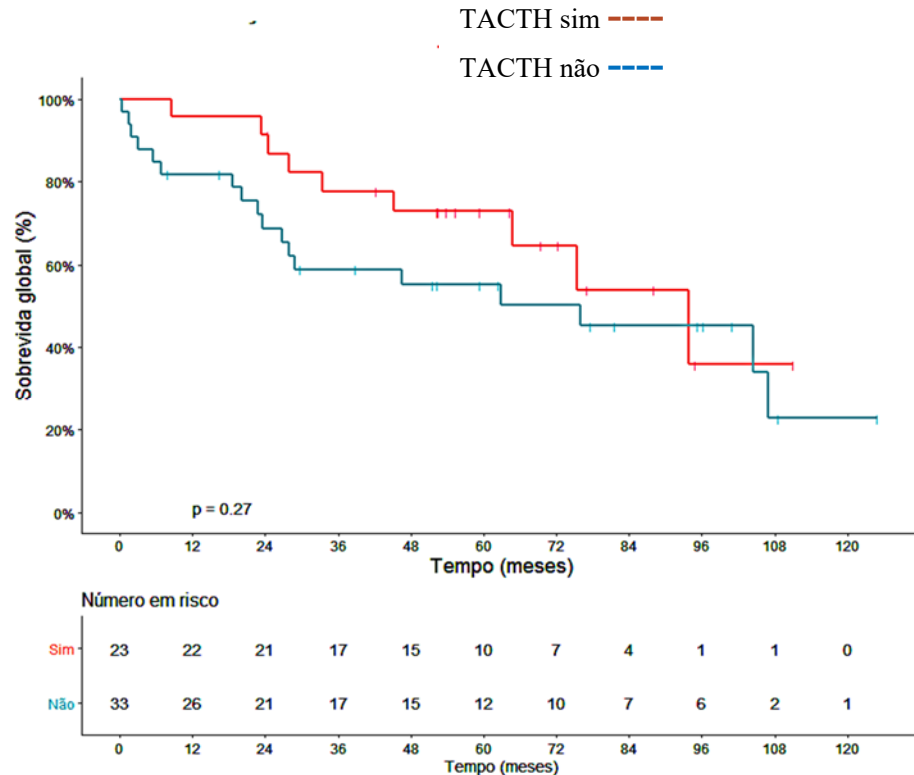


**Figura 42** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com o uso ou não de citarabina em alta dose

A resposta obtida com o tratamento, ao ser dividida entre os que apresentaram resposta completa ou resposta completa não confirmada e aqueles que não a obtiveram também não atingiu significância estatística ( $p=0,067$ ) (Figura 43). Outrossim, não se obteve significância estatística entre os grupos que foram ou não submetidos a TACTH como consolidação ao tratamento inicial ( $p=0,27$ ) (Figura 44).



**Figura 43** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com obtenção ou não de resposta completa ou resposta completa não confirmada ao tratamento quimioterápico



**Figura 44** - Curva atuarial de sobrevida global (SG) para 63 pacientes portadores de Linfoma de Células do Manto diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2008 a dezembro de 2014 de acordo com realização ou não de TACTH

### 5.3 MODELO DE REGRESSÃO DE COX SIMPLES

Com o objetivo de avaliar a influência de cada variável independente na taxa de ocorrência de óbito, ajustou-se um modelo de regressão de Cox simples para cada variável independentemente de interesse (covariável).

Assim, na Tabela 15 há estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples para dados clínicos, onde é possível observar que a única variável independente significativas foi idade

**Tabela 15** - Estimativas dos parâmetros clínicos de acordo com modelo de regressão de Cox simples.

| Variável                   | Categoria   | Hazard Ratio (HR) | IC (95%) para RR |          | Valor p |
|----------------------------|-------------|-------------------|------------------|----------|---------|
|                            |             |                   | Inferior         | Superior |         |
| Idade                      | <=70 anos   | Ref.              |                  |          |         |
|                            | >70 anos    | 3,021             | 1,011            | 9,025    | 0,048   |
| Idade                      | Contínua    | 1,049             | 1,007            | 1,094    | 0,023   |
| Sexo                       | Masculino   | 1,778             | 0,241            | 1,479    | 0,265   |
| Localização                | Nodal       |                   |                  |          | 0,954   |
|                            | Extra nodal | 1,040             | 0,428            | 2,524    | 0,932   |
|                            | Nodal +     |                   |                  |          |         |
|                            | Extra nodal | 1,186             | 0,397            | 3,545    | 0,761   |
| Massa >7,5cm               |             | 2,776             | 0,642            | 12,014   | 0,172   |
| Ann Arbor                  | II          |                   |                  |          | NA      |
|                            | III         | NA                | NA               | NA       | NA      |
|                            | IV          | NA                | NA               | NA       | NA      |
| Sintomas sistêmicos        | Sim         |                   |                  |          |         |
|                            | Não         | 0,938             | 0,380            | 2,316    | 0,889   |
| Esplenomegalia             | Sim         |                   |                  |          |         |
|                            | Não         | 3,598             | 0,853            | 15,166   | 0,081   |
| Comprometimento extranodal | Sim         |                   |                  |          |         |
|                            | Não         | 0,759             | 0,354            | 1,630    | 0,480   |

NA= não foi possível calcular risco do evento devido ao pequeno número de casos ou de óbitos em um dos grupos de comparação

Na Tabela 16 há as estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples para dados laboratoriais, onde é possível observar que as variáveis independentes significativas foram: concentração de hemoglobina, número de leucócitos, de linfócitos e concentração de albumina. Contudo, quando consideradas como variáveis contínuas apenas o número de plaquetas e a concentração de albumina mantiveram a significância.

**Tabela 16** - Estimativas dos parâmetros laboratoriais de acordo com modelo de regressão de Cox simples

| Variável   | Categoria                 | Hazard Ratio (HR) | IC (95%) para RR |          | Valor <i>p</i> |
|------------|---------------------------|-------------------|------------------|----------|----------------|
|            |                           |                   | Inferior         | Superior |                |
| [Hb] g/dl  | ≤12                       | Ref.              | 0,181            | 0,836    | 0,016          |
|            | >12                       | 0,389             |                  |          |                |
| [Hb]g/dl   | contínua                  | 0,835             | 0,679            | 1,027    | 0,088          |
| Leucocitos | ≤6,0 x 10 <sup>9</sup> /l | Ref.              | 0,181            | 0,857    | 0,019          |
|            | >6,0 x 10 <sup>9</sup> /l | 0,394             |                  |          |                |
| Leucocitos | contínua                  | 0,916             | 0,814            | 1,031    | 0,145          |
| Linfócitos | ≤980 x10 <sup>6</sup> /l  | Ref.              | 0,124            | 0,933    | 0,036          |
|            | >980 x10 <sup>6</sup> /l  | 0,340             |                  |          |                |
| Linfocitos | contínua                  | 1,000             | 1,0              | 1,0      | 0,450          |
| Monocitos  | ≤580 x10 <sup>6</sup> /l  | Ref.              | 0,000            | 5,875    | 0,204          |
|            | >580 x10 <sup>6</sup> /l  | 0,038             |                  |          |                |
| Monocitos  | contínua                  | 0,999             | 0,997            | 1,001    | 0,356          |
| Plaquetas  | ≤146 x10 <sup>6</sup> /l  | Ref.              | 0,121            | 0,580    | 0,001          |
|            | >146 x10 <sup>6</sup> /l  | 0,265             |                  |          |                |
| Plaquetas  | contínua                  | 0,994             | 0,989            | 0,999    | 0,012          |
| DHL/DHLVSN | ≤1,44                     | Ref.              | 0,490            | 2,439    | 0,828          |
|            | >1,44                     | 1,093             |                  |          |                |
| DHL/DHLVSN | contínua                  | 1,505             | 0,559            | 4,051    | 0,419          |
| Albumina   | ≤3,8g/dl                  | Ref.              | 0,097            | 0,560    | 0,001          |
|            | >3,8g/dl                  | 0,233             |                  |          |                |
| Albumina   | contínua                  | 0,240             | 0,087            | 0,665    | 0,006          |

Na Tabela 17 há as estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples para índices e fatores prognósticos. Nela é possível observar que as variáveis independentes significativas foram: MIPI, MIPI-b e Ki-67. No entanto, quando consideradas como variáveis contínuas apenas MIPI-b e Ki-67 mantiveram sua significância

**Tabela 17** - Estimativas dos dados de prognóstico de acordo com modelo de regressão de Cox simples

| Variável | Categoria     | Hazard Ratio (HR) | IC (95%) para RR |          | Valor p |
|----------|---------------|-------------------|------------------|----------|---------|
|          |               |                   | Inferior         | Superior |         |
| MIPI     | ≤6,3          | Ref.              |                  |          |         |
|          | >6,3          | 3,245             | 1,287            | 8,181    | 0,013   |
| MIPI     | contínua      | 1,481             | 0,737            | 2,975    | 0,270   |
| MIPI-b   | ≤6,8          | Ref.              |                  |          |         |
|          | >6,8          | 4,310             | 1,961            | 9,473    | <0,001  |
| MIPI-b   | contínua      | 1,662             | 1,077            | 2,566    | 0,022   |
| MIPI s   | Baixo         | Ref.              |                  |          |         |
|          | Intermediario | 0,674             | 0,263            | 1,727    | 0,411   |
|          | Alto          | 1,036             | 0,402            | 2,670    | 0,942   |
| MIPI-bs  | Baixo         | Ref.              |                  |          | 0,064   |
|          | Intermediario | 0,436             | 0,157            | 1,214    | 0,112   |
|          | Alto          | 1,307             | 0,529            | 3,231    | 0,562   |
| Ki-67    | ≤40%          | Ref.              |                  |          |         |
|          | >40%          | 3,993             | 1,667            | 9,564    | 0,002   |
| Ki-67    | contínua      | 1,017             | 1,004            | 1,030    | 0,009   |
| p53      | 0-9%          | Ref.              |                  |          |         |
|          | 10-50%        | 1,00              | NA               | NA       | NA      |
|          | >50%          | 1,00              | NA               | NA       | NA      |
| p53      | Positivo      | Ref.              |                  |          |         |
|          | Negativo      | 3,587             | 0,396            | 32,468   | 0,256   |

NA= não foi possível calcular risco do evento devido ao pequeno número de casos ou de óbitos em um dos grupos de comparação

Na Tabela 18 há as estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples para dados de tratamento onde é possível observar que não houve variáveis independentes significativas.

**Tabela 18** - Estimativas dos parâmetros de tratamento de acordo com modelo de regressão de Cox simples.

| Variável | Categoria     | Hazard Ratio (HR) | IC (95%) para RR |          | Valor p |
|----------|---------------|-------------------|------------------|----------|---------|
|          |               |                   | Inferior         | Superior |         |
| Base QT  | citarabina    | Ref.              |                  |          | 0,419   |
|          | doxorrubicina | 1,451             | 0,569            | 3,699    | 0,435   |
|          | fludarabina   | 2,527             | 0,949            | 6,730    | 0,064   |
|          | bortezomibe   | NA                | NA               |          | NA      |
|          | outro         | NA                | NA               | NA       | NA      |
| Ara-C    | sim           | Ref.              |                  |          |         |
|          | não           | 1,344             | 0,626            | 2,883    | 0,448   |
| RCC/RCNC | sim           | Ref.              |                  |          |         |
|          | não           | 2,127             | 0,931            | 4,863    | 0,074   |
| TACTH    | sim           | Ref.              |                  |          |         |
|          | não           | 1,566             | 0,698            | 3,515    | 0,277   |

NA= não foi possível calcular risco do evento devido ao pequeno número de casos ou de óbitos em um dos grupos de comparação.

Na Tabela 19 há as estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Cox simples para marcadores imuno-histoquímicos de angiogênese. Nela é possível observar que não houve variáveis independentes significativas.

**Tabela 19** - Estimativas dos parâmetros de angiogênese de acordo com modelo de regressão de Cox simples.

| Variável      | Categoria            | Hazard Ratio (HR) | IC (95%) para RR |          | Valor p |
|---------------|----------------------|-------------------|------------------|----------|---------|
|               |                      |                   | Inferior         | Superior |         |
| CD34          | Negativo<br>Positivo | 0,425             | 0,108            | 1,665    | 0,219   |
| CD34          | contínuo             | 0,957             | 0,823            | 1,112    | 0,565   |
| VEGF          | 0                    |                   |                  |          | 0,576   |
|               | 1-9%                 | 0,581             | 0,096            | 3,516    | 0,554   |
|               | 10-50%               | 0,482             | 0,105            | 2,206    | 0,347   |
|               | >50%                 | 0,216             | 0,022            | 2,086    | 0,185   |
| VEGF          | Negativo<br>Positivo | Ref.<br>0,498     | 0,144            | 1,731    | 0,273   |
| HIF- $\alpha$ | 0                    |                   |                  |          | 0,809   |
|               | 1-9%                 | 0,471             | 0,049            | 4,544    | 0,515   |
|               | 10-50%               | 0,776             | 0,129            | 4,656    | 0,781   |
|               | >50%                 | 0,504             | 0,112            | 2,260    | 0,371   |
| HIF- $\alpha$ | Negativo<br>Positivo | Ref.<br>0,731     | 0,205            | 2,598    | 0,628   |

#### 5.4 MODELO DE RISCOS PROPORCIONAIS DE COX MÚLTIPLO

Para a construção dos modelos multivariados, foram selecionadas as variáveis que atingiram níveis de significância estatística na análise univariada. Também foram selecionadas variáveis relacionadas a angiogênese as quais foram de interesse no presente estudo.

A seleção das variáveis para o modelo final foi obtida pelo método de “*stepwise backward*” e a significância estatística foi determinada para um valor  $p < 0,05$ .

Na Tabela 20 tem-se as estimativas dos parâmetros do modelo de riscos proporcionais de Cox múltiplo (modelo final) fazendo uso das variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais. As variáveis independentes consideradas no modelo inicial foram: idade, número de plaquetas, concentração de albumina, valor de Ki-67 e MIPI-b. Todas estas variáveis foram consideradas como contínuas. Nesse cenário, o  $n$  válido foi de 47, sendo 19 pacientes falecidos. Por meio dos resultados foi possível observar que idade e albumina foram fatores independentes que explicaram a taxa de ocorrência do óbito. Assim, à medida que a idade aumenta, o risco do paciente ir a óbito aumenta (HR=1,076; valor  $p=0,005$ ) de modo que o incremento de 1 ano na idade leva a um aumento de 7,6% no risco do paciente falecer mantido o valor de albumina

fixado. Por outro lado, para cada incremento de uma unidade na concentração de albumina, espera-se uma redução de 79,9% (HR=0,201; valor  $p=0,005$ ) no risco de o paciente ir a óbito mantido a idade constante.

**Tabela 20** - Estimativas dos parâmetros quantitativos pelo modelo de regressão de Cox múltiplo.

| Variável                 | Estimativa | EP    | HR    | IC (95%) |          | valor p      |
|--------------------------|------------|-------|-------|----------|----------|--------------|
|                          |            |       |       | Inferior | Superior |              |
| Idade diagnóstico (anos) | 0,073      | 0,026 | 1,076 | 1,022    | 1,133    | <b>0,005</b> |
| Albumina (PTF)           | -1,606     | 0,572 | 0,201 | 0,065    | 0,616    | <b>0,005</b> |

Variáveis inseridas no modelo inicial: idade, número de plaquetas, concentração de albumina e valor de Ki-67. E MIPI-b \*EP: erro padrão, HR: *Hazard-Ratio*.

Também avaliamos as variáveis idade, número de plaquetas, concentração de albumina, valor de Ki-67 e MIPI-b com os respectivos valores de ponto de corte previamente estabelecidos ou seja: para idade  $\leq 70$  anos ou  $> 70$  anos; para número de plaquetas  $\leq 146 \times 10^9/l$  ou  $> 146 \times 10^9/l$ , para albumina  $\leq 3,8$  g/dl ou  $> 3,8$ g/dl e para Ki-67  $\leq 40\%$  ou  $> 40\%$  e para MIPI-b  $\leq 6,8$  ou  $> 6,8$ . Na Tabela 21 estão as estimativas dos parâmetros do modelo de riscos proporcionais de Cox múltiplo para a sobrevida global. De acordo com estes resultados a variável idade atuou como um fator de risco. Assim, os pacientes com idade superior a 70 anos possuíram um risco aumentado de mais de 8 vezes (HR=8,025; valor  $p=0,0101$ ) de ir à óbito em relação aqueles com idade menor ou igual a 70 anos. O número de plaquetas também foi um fator de risco de modo que sua influência no risco de óbito atuou como um fator protetor (HR=0,231; valor  $p=0,003$ ), isto é, pacientes com contagem de plaquetas acima de  $146 \times 10^9/l$  tiveram redução de risco de óbito em 78% em relação aqueles pacientes com número de plaquetas igual ou inferior a este valor. Nesta análise, o valor de concentração de albumina não mostrou significância.

**Tabela 21** - Estimativas dos parâmetros qualitativos pelo modelo de regressão de Cox múltiplo.

| Variável     | Categoria | Estimativa | EP    | HR    | IC (95%) |          | valor p      |
|--------------|-----------|------------|-------|-------|----------|----------|--------------|
|              |           |            |       |       | Inferior | Superior |              |
| Idade (anos) | ≤70       |            |       | Ref   |          |          | <b>0,001</b> |
|              | >70       | 2,083      | 0,651 | 8,025 | 2,240    | 28,745   |              |
| Plaquetas    | ≤146      |            |       | Ref   |          |          | <b>0,003</b> |
|              | >146      | -1,464     | 0,501 | 0,231 | 0,087    | 0,617    |              |

Variáveis inseridas no modelo inicial: idade, número de plaquetas, concentração de albumina e valor de Ki-67.

\*EP: erro padrão, HR: *hazard ratio*.

Como variáveis de maior interesse no presente estudo consideramos os marcadores de microdensidade vascular e angiogênese, bem como idade, contagem de plaquetas, Ki67, albumina e MIPI-b como fatores independentes para explicar a taxa de óbito. No entanto, uma vez que o tamanho da amostra válido reduziu para 24 pacientes, o modelo de Cox múltiplo não foi possível de ser ajustado inviabilizando assim seu uso.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 ASPECTOS GERAIS

Estudos do metabolismo da célula neoplásica e suas interações com o microambiente tumoral passaram a ser desenvolvidos e relacionados com o prognóstico dos portadores de LNH a partir do início do século XXI. Dentre os elementos integrantes do microambiente tumoral a angiogênese teve destaque motivado pelo sucesso obtido em tumores sólidos e Mieloma Múltiplo. No entanto, estudos que agruparam diferentes subtipos de LNH e sua relação com a angiogênese apresentaram resultados conflitantes enquanto aqueles que consideraram apenas pacientes com LCM foram escassos. Isso pode ter contribuído para as limitações e o insucesso no tratamento destes pacientes pois, apenas nos últimos 5 anos quando passou a haver melhores definições na conduta terapêutica destes pacientes. Desde então os pacientes com LCM obtiveram um acréscimo de sobrevida de 2,5 anos para até além de 7 anos.

Entretanto esta doença ainda permanece incurável e este ganho de sobrevida não se estendeu a todos os pacientes. Beneficiaram-se sobretudo os pacientes mais jovens ou aqueles que suportaram a toxicidade do tratamento sugerido. Para maior disponibilidade de tratamentos menos tóxicos e maior diversidade em terapias torna-se importante definir melhor o prognóstico dos pacientes com Linfoma de Células do Manto no cenário de maior compreensão da relação da célula neoplásica com seu microambiente. Neste aspecto o papel da angiogênese permanece pouco explorado. No Brasil estudos relacionados ao microambiente tumoral e angiogênese nos Linfomas não Hodgkin são inexistentes e estudos referentes aos portadores de Linfoma de Células do Manto e os fatores que mais influenciam no seu óbito são escassos.

Deste modo, o presente estudo objetivou: (i) reunir a casuística de LCM de um único centro brasileiro especializado no diagnóstico e tratamento de neoplasias; (ii) levantar dados demográficos e clínicos; e (iv) comparar os achados clínicos, laboratoriais, de angiogênese e de tratamento, buscando fatores que possam se relacionar com a morte do paciente. Assim, analisamos dados demográficos, clínicos, laboratoriais, de tratamento empregado, de MDV e angiogênese na população de pacientes com diagnóstico Linfoma de Células do Manto não indolente de janeiro de 2006 a dezembro de 2014 diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center.

Este estudo apresentou casuística de 63 pacientes - número comparável a estudos unicêntricos como de Bosch et al.<sup>32</sup> e Samaha et al.<sup>112</sup>. Os 63 pacientes avaliados tiveram mediana de Sobrevida Global de 93,91 meses. Este dado mostra-se semelhante ao observado atualmente<sup>109,110</sup> e distante do verificado em estudos de Zucca et al.<sup>64</sup>, Decaudin et al.<sup>115</sup> e Bosch et al.<sup>32</sup> publicados ao final da década de 90 já refletindo o impacto do emprego de rituximabe, do uso de citarabina em alta dose que passaram a ser uso corrente na 1ª década do século XXI e da disponibilidade de alguns novos fármacos alvo-específicos.

## 6.2 ASPECTOS RELACIONADOS A ANGIOGÊNESE

As variáveis avaliadas com relação a angiogênese não demonstraram significância estatística em nosso estudo o que diferiu dos resultados obtidos recentemente em outros estudos.

Vasela et al.<sup>23</sup> em 2014, avaliaram a MDV utilizando-se de CD34 em 175 pacientes, mas incluíram pacientes tratados de 1996 a 2008 o que abrangeu períodos distintos nas diretrizes de tratamento repercutindo na heterogeneidade das condutas terapêuticas, como o uso ou não de rituximabe ou citarabina em alta dose. Este estudo permitiu a conclusão de que a MDV se relacionaria com o prognóstico apenas nos casos tratados convencionalmente, isto é, segundo os autores, aqueles tratados sem citarabina em alta dose. Já Petrakis et al.<sup>101</sup> não levaram em conta o tratamento escolhido em 56 pacientes e, embora se utilizassem do mesmo marcador, isto é, CD34, o resultado obtido relacionou e estratificou a intensidade da MDV com o prognóstico nos 38 pacientes com LCM que apresentaram positividade para SOX-11.

Nosso resultado pode ter sido determinado por alguns fatores. Primeiro, é possível que os marcadores utilizados para avaliar MDV e angiogênese não tenham sido sensíveis o suficiente para determinar sua magnitude pois, embora tenhamos utilizado o marcadores CD34 para quantificação da MDV e, VEGF e HIF- $\alpha$  para avaliação de angiogênese tecidual há, no entanto, outros marcadores a serem explorados como PDGF e Tsp-1, que ajudam a estabelecer equilíbrio entre pró e anti-angiogênese em tecido normal o qual se apresenta rompido no tecido neoplásico. Segundo, em histologia, novos métodos de quantificação de MDV que se utilizam de “*software*” específicos como os utilizados por Petrakis et al.<sup>101</sup> começam a surgir, assim como o uso de ultrassonografia microscópica ou microscopia de fluorescência tendem a tornar a avaliação de MDV mais objetiva<sup>117-119</sup>. Terceiro, o uso de avaliação através da dosagem sérica destas proteínas antes do início do tratamento, isto é, em estudo prospectivo, cuja comparação com análise histológica é ainda pouco explorada poderia fornecer resultados mais

consistentes e, finalmente, quarto: diferentemente de Petrakis et al.<sup>101</sup> não distinguimos em nosso grupo os pacientes positivos e negativos para a marcação com SOX-11

Diante disso, acreditamos que, apesar da não significância estatística e das peculiaridades de nossa amostra trata-se de campo ainda a ser explorado.

### 6.3 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

As características demográficas e clínicas foram coletadas e avaliadas em toda a população analisada. Ressaltamos que no presente estudo foram excluídos pacientes com diagnóstico de Linfoma do Manto Indolente devido as peculiaridades clínicas e especificidades moleculares que garantem prognóstico diferente do observado nos pacientes portadores Linfoma do Manto Clássico.

Deste modo, no que tange a dados demográficos e clínicos, a casuística mostrou pouca diferença com relação aos dados encontrados em literatura<sup>64,109-116</sup>. Os pacientes mostraram-se preferencialmente do sexo masculino, com mediana de idade entre 5ª e 6ª décadas de vida e já com doença avançada ao diagnóstico uma vez que 90% dos pacientes apresentaram-se em estágio III ou IV de Ann Arbor e cerca de 75% dos pacientes queixaram-se de sintomas sistêmicos. Além disso, aproximadamente 20% dos pacientes apresentaram esplenomeglia ao diagnóstico e cerca de 1/3 mostrou comprometimento extranodal diferente da medula óssea - nestes casos o comprometimento gastrointestinal foi o mais frequente. Quanto a “*performance status*” na admissão, mais de 90% dos pacientes apresentaram -se com ECOG 0 ou 1 o que pode refletir um viés de nossa amostra dificultando análise estatística mais aprofundada.

Quando estes dados foram submetidos a análise univariada somente a idade mostrou relevância para o prognóstico dos pacientes. Hoster et al.<sup>37</sup>, Schrader et al.<sup>113</sup> e Oinonen et al.<sup>112</sup> também já destacaram a importância da idade no prognóstico dos pacientes com LCM. Todavia, diferente do que ocorreu nestas publicações onde o grupo de pior prognóstico foi definido como indivíduos acima de 60 anos, em nossa casuística os pacientes apresentaram pior prognóstico somente quando com idade superior a 70 anos. Nosso resultado foi semelhante ao encontrado por Samaha et al.<sup>111</sup> em 1998, porém este estudo foi realizado em época anterior ao uso de anticorpos monoclonais, ao uso de citarabina em alta dose e ao uso de TACTH em primeira remissão. Além disso, em nosso estudo o fator idade manteve a significância estatística mesmo quando a considerado como variável contínua. Em análise multivariada, a idade manteve sua importância como definidor de Sobrevida Global no grupo estudado com acréscimo de quase 2 % de risco de óbito para cada ano de vida. Se a importância da idade já havia sido mostrada em

estudos anteriores e em variados índices prognósticos de pacientes com Linfoma não Hodgkin, a intensidade com que afetou o risco de morte em nossa população deve ser ressaltada ratificando a importância da busca de alternativas de tratamento para pacientes mais idosos.

#### 6.4 ASPECTOS LABORATORIAIS

Com relação aos dados laboratoriais o valor de concentração de hemoglobina mostrou significância estatística conforme outras publicações<sup>36, 64, 113-115</sup> de modo que pacientes com valores inferiores a 12 g/dl apresentaram pior prognóstico. Hoster et al.<sup>37</sup> também encontraram o valor de hemoglobina como fator prognóstico de significância estatística contudo, somente com valor de hemoglobina inferior a 10g/dl. No entanto, assim como estes autores, ao considerarmos hemoglobina como valor contínuo, a significância não se sustentou.

O número de leucócitos, assim como para outras publicações<sup>32,37, 64, 113</sup>, também mostrou relevância prognóstica em nosso estudo. Entretanto, diferentemente destas, em nosso caso não foi a leucocitose que definiu pior prognóstico e sim o número de leucócitos inferior a  $6,0 \times 10^9/l$ . Este dado vai de encontro a maioria das publicações. Isto pode ser explicado por alguns fatores: primeiramente, várias publicações que definem leucocitose como fator desfavorável para o prognóstico levam em consideração a presença ou não de células do LCM em sangue periférico, em segundo lugar a maioria destas publicações foi realizada em era anterior ao uso dos recursos terapêuticos de que dispomos atualmente. É possível também que este resultado possa ser explicado por um viés em nossa amostra uma vez que o caso de maior leucometria em nossa casuística foi de  $26,0 \times 10^9/l$ . No entanto, nos parece que mais do que quantidade de doença, o resultado obtido pode ter refletido o estado imunológico dos pacientes e acreditamos que novos estudos no cenário das novas opções terapêuticas precisam ser realizados a fim de ratificar a leucometria como elemento prognóstico. Embora este mesmo entendimento pode ser estendido ao número de linfócitos e de monócitos, nem número de leucócitos, nem de linfócitos ou de monócitos sustentaram a significância estatística quando foram consideradas como variáveis contínuas ou realizada a análise univariada.

Por outro lado, o número de plaquetas apresentou resultado com significância estatística. Em nossa casuística os pacientes que apresentaram número de plaquetas superior a  $146 \times 10^9/l$  ao diagnóstico apresentaram melhor prognóstico. A avaliação do número de plaquetas também foi realizada no LCM por Hoster et al.<sup>37</sup> porém, neste caso a significância se deu com o valor de  $100 \times 10^9/l$  e não persistiu ao ser submetida a análise univariada. Em nosso estudo a diferença persistiu tanto ao aplicarmos o modelo de regressão de Cox como ao

considerarmos o valor de plaquetas como variável contínua. No entanto, ao aplicarmos o modelo de análise multivariada, o valor de plaquetas não se mostrou capaz de explicar o risco de morte.

Outros dados laboratoriais que avaliamos além do hemograma foram a concentração de DHL e o valor de albumina. O valor da concentração de DHL, por refletir indiretamente o grau de proliferação celular, foi avaliado como marcador prognóstico por diversos autores<sup>32,37,65, 113, 115-117</sup> e a maioria deles encontrou relação negativa entre o valor de DHL e a sobrevida global<sup>32, 37,65, 109-113,115</sup>. Em nosso estudo esta relação foi confirmada. Entretanto por não ter havido uma uniformidade do método laboratorial para quantificação do valor de DHL não utilizamos seu valor absoluto, mas a razão entre o valor de DHL obtido e o valor do limite superior de normalidade do respectivo método. Deste modo obtivemos que pacientes cuja relação mostrou-se superior a 1,44 apresentaram pior prognóstico. Esta relação entre o valor da concentração de DHL obtido e o limite superior de normalidade do método foi explorado por Hoster et al.<sup>37</sup> que também demonstraram relação inversa com a sobrevida global. Também ao encontro destes autores, ao aplicarmos o modelo de regressão de Cox, a significância estatística entre estes grupos persistiu, mas desapareceu ao considerarmos o valor como variável contínua. Este valor também não se relacionou a morte quando em modelo de regressão multivariada. Neste caso, uma vez que a proliferação celular tem, sabidamente, clara relação com o prognóstico dos pacientes e o valor de DHL é a ela relacionada, cremos que o tamanho da amostra pode ter interferido no resultado.

Por outro lado, pouco explorado é o valor de concentração de albumina sérica no LCM. Hoster et al.<sup>37</sup> avaliaram este valor para construção do MIPI, todavia não obtiveram significância estatística ao dividir os pacientes entre aqueles cujo resultado fora acima ou abaixo do normal. Em nosso estudo esta significância estatística foi conseguida ao dividirmos os pacientes entre os de concentração superior e inferior a 3,8 g/dl. Acreditamos que a importância da hipoalbuminemia pode ser explicado por ser não apenas sinal indireto do comprometimento inflamatório por qualquer doença sistêmica como reflexo do status nutricional do paciente. O comprometimento sistêmico dos pacientes é provável pelo fato de 90% deles já se encontrarem em estágio IV ao diagnóstico, mas inferências a respeito do estado nutricional dos pacientes e sua comparação com o de pacientes de outros estudos estão além do nosso escopo. Ao aplicarmos o modelo de regressão de Cox a significância do valor da concentração de albumina sérica persistiu e se manteve ao considerarmos o valor contínuo tanto para análise univariada quanto multivariada. Deste modo, podemos afirmar que para indivíduos de mesma idade o incremento na concentração de albumina reduz o risco de morte.

## 6.5 ASPECTOS RELACIONADOS A ÍNDICES PROGNÓSTICOS E TRATAMENTO

Quando avaliamos os índices prognósticos em nossa amostra tanto Ki-67, quanto o MIPI e MIPI-b mostraram significância estatística em nossa amostra. Estes dados já eram esperados uma vez que todos os três parâmetros já são consolidados como de relevância para o prognóstico dos pacientes com LCM. No entanto, somente Ki-67 e MIPI-b mantiveram sua significância quando os consideramos como variáveis contínuas em modelo de regressão de Cox simples. Contudo, talvez pelo tamanho de nossa amostra, nenhum deles foi capaz de se relacionar a mortalidade quando submetidos ao modelo de regressão de Cox múltiplo.

De todas as variáveis avaliadas que se relacionaram ao tratamento, nenhuma delas foi capaz de demonstrar significância estatística. Uma vez que o uso de citarabina em alta dose e a realização do TACTH em primeira remissão são consolidados como elementos que prolongam o tempo de vida destes pacientes, apenas podemos explicar estes dados por características da amostra uma vez que menos de 50% dos pacientes submeteram-se a tratamento que teve como base citarabina em dose elevada. Isto provavelmente ocorreu devido ao risco de maior toxicidade desta medicação nesta dose já que mais de 60% dos pacientes apresentavam-se com idade superior a 60 anos ao diagnóstico. O mesmo motivo pode explicar o porquê de menos de 40% dos pacientes submeterem-se a TACTH. A não significância estatística do grau de resposta obtido ao término do primeiro tratamento como fator para o óbito pode ser explicada por dois motivos : por um lado o fato de alguns pacientes, mesmo tendo obtido apenas resposta parcial, terem sido submetidos a TACTH podem ter prejudicado o desfecho deste grupo de pacientes tornando-o menos favorável , por outro lado o uso de novas terapias alvo-específicas que tornam o tratamento mais tolerável prolongando o tempo de vida pode ter favorecido um subgrupo de pacientes que, recidivados após TACTH, encontraram tratamento bem sucedido.

Por fim, compreendemos que nosso estudo apresenta algumas limitações, como o número total de pacientes, o número de amostras utilizadas e o fato de ter sido realizado em apenas uma instituição. Contudo, os achados estatísticos foram significativos e relevantes. Apesar de limitações da amostra (63 casos estudados e de 34 amostras analisadas), trata-se de uma das maiores em literatura nacional, uma das raras que utilizou apenas pacientes com Linfoma de Células do Manto e uma das poucas que tentou buscar os fatores que predissessem sua morte em nosso meio. Além disso, não há estudos em literatura sul-americana que avaliem a angiogênese em Linfoma de Células do Manto.

Novos estudos prospectivos e multicêntricos ainda deverão ser realizados a fim de avaliar fatores prognósticos em nosso meio e a coleta de novos dados e amostras com outros marcadores poderão definir melhor se a presença do estímulo a angiogênese realmente pode predizer, não somente um maior risco de morte, mas também representar uma forma de bloquear o desenvolvimento do tecido neoplásico.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições do presente estudo permitem concluir o seguinte:

- 1- Não houve significância estatística entre os dados de angiogênese obtidos e a chance de morte.
- 2- O exame de imunohistoquímica para CD34 mostrou a presença em média de cerca de 15 vasos/mm<sup>2</sup> nas amostras de Linfoma de Células do Manto. Nestas amostras, os exames de imunohistoquímica para VEGF e HIF-1 $\alpha$  mostraram-se de pelo menos 10% em mais de 64% das amostras.
- 3- O paciente com Linfoma de Células do Manto do A.C.Camargo geralmente é homem, entre a 5ª e 6ª décadas de vida, apresenta-se em estágio avançado e com MIPI e MIPI-b de riscos baixo ou intermediário.
- 4- A idade e a concentração de albumina foram fatores independentes para maior risco de óbito quando considerados valores contínuos no modelo multivariado. Quando considerados valores de corte, idade acima de 70 anos e contagem de plaquetas inferior a  $146 \times 10^9/l$  foram fatores independentes para maior risco de óbito.
- 5- A cada ano de idade acrescido houve chance de 7,6% a mais do paciente ir a óbito e pacientes com idade acima de 70 anos apresentaram risco de óbito 8 vezes maior que os casos de idade igual ou inferior a 70 anos. Albumina e contagem de plaquetas foram elementos protetores de modo que o acréscimo de concentração de albumina e número de plaquetas superior a  $140 \times 10^9/l$  podem reduzir o risco de morte.

## 8 REFERÊNCIAS

- 1 Rappaport H, Winter W, Hicks E. Follicular lymphoma. A re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer*. 1956;9(4):792-821.
- 2 Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peters C, Gatter K, et al. Mantle cell lymphoma: a proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol*. 1992;16(7):637-40.
- 3 Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-92.
- 4 Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
- 5 Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010;116(19):3724-34.
- 6 Smedby KE, Hjalgrim H. Epidemiology and etiology of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(5):293-8.
- 7 Zhou Y, Wang H, Fang W, Romaguer JE, Zhang Y, Delasalle KB, et al. Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. *Cancer*. 2008;113(4):791-8.
- 8 Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992–2001. *Blood*. 2006;107(1):265-76.

- 9 Hartmann EM, Campo E, Wright G, Lenz G, Salaverria I, Jares P, et al. Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high resolution gene expression and copy number profiling. *Blood*. 2010;116(6):953-61.
- 10 Lim S, Kaldis P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 2013;140(15):3079-93.
- 11 Royo C, Salaverria I, Hartmann EM, Rosenwald A, Campo E, Beà S. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(5):322-34.
- 12 Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 1998;92(6):725-34.
- 13 Grønbaek K, Worm J, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Hokland P, Guldberg P. ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2002;100(4):1430-7.
- 14 Tort F, Hernandez S, Bea S, Camacho E, Fernandez V, Esteller M, et al. Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms. *Leukemia*. 2005;19(1):112-7.
- 15 Li Q, Verna IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):725-34.
- 16 Cao X, Fan L, Fang C, Zhu DX, Dong HJ, Wang DM, et al. The expression of SOX11, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3 in B-cell lymphocytic proliferative diseases. *Med Oncol*. 2012;29(2):1190-6.
- 17 Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, et al. Cyclin-D1 negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005;106(13):4315-21.

- 18 Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, Matsuno Y, Ichinohasama R, Okamoto M, et al. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*. 2000;95(7):2253-61.
- 19 Nygren L, Wennerholm SB, Klimkowska M, Christensson B, Kimby E, Sander B. Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2012;119(18):4215-23.
- 20 Chen YH, Gao J, Fan G, Peterson LC. Nuclear expression of sox11 is highly associated with mantle cell lymphoma but is independent of t (11; 14) (q13; q32) in non-mantle cell B-cell neoplasms. *Mod Pathol*. 2010;23(1):105-12.
- 21 Palomero J, Vegliante MC, Rodríguez ML, Eguileor A, Castellano G, Planas-Rigol E, et al. SOX11 promotes tumor angiogenesis through transcriptional regulation of PDGFA in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2014;124(14):2235-47.
- 22 Campo E, Rule S. Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. *Blood*. 2015;125(1):48-55.
- 23 Veselá P, Tonar Z, Šálek D, Vokurka S, Trněný M, Kodet R, et al. Microvessel density of mantle cell lymphoma: a retrospective study of its prognostic role and the correlation with the Ki-67 and the mantle cell lymphoma international prognostic index in 177 cases. *Virchows Arch*. 2014;465(5):587-97.
- 24 Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, Chen YH. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(5):699-706.
- 25 Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2011;117(1):26-38.
- 26 Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3416-23.

- 27 Zanetto U, Dong H, Huang Y, Zhang K, Narbaitz M, Sapia S, et al. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10. *Histopathology*. 2008;53(1):20-9.
- 28 Kelemen K, Peterson LC, Helenowski I, Goolsby CL, Jovanovic B, Miyata S, et al. CD23+ mantle cell lymphoma: a clinical pathologic entity associated with superior outcome compared with CD23– disease. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(2):166-77.
- 29 Burger JA, Ford RJ. The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(5):308-12.
- 30 Ghilmini M, Zucca E. How I treat mantle cell lymphoma. *Blood*. 2009;114(8):1469-76.
- 31 Cheah CY, George A, Gin'e E, Chiappella A, Kluin-Nelemans HC, Jurczak W, et al. Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma: clinical features, prognostic factors and outcomes from the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Ann Oncol*. 2013;24(8):2119-23.
- 32 Bosch F, López-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, et al. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer*. 1998;82(3):567-75.
- 33 Abrahamsson A, Albertsson-Lindblad A, Brown PN, Baumgartner-Wennerholm S, Pedersen LM, D'Amore F, et al. Real world data on primary treatment for mantle cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group observational study. *Blood*. 2014;124(8):1288-95.
- 34 Ondrejka SL, Lai R, Smith SD, Hsi ED. Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica*. 2011;96(8):1121-7.
- 35 The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;329(14):987-94.

- 36 Møller MB, Pedersen NT, Christensen BE Mantle cell lymphoma: prognostic capacity of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Br J Haematol.* 2006;133(1):43-9.
- 37 Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced mantle cell lymphoma. *Blood.* 2008;111(2):558-65.
- 38 van de Schans SA, Janssen-Heijnen ML, Nijziel MR, Steyerberg EW, van Spronsen DJ. Validation, revision and extension of the Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index in a population- based setting. *Haematologica.* 2010;95(9)1503-9.
- 39 Todorovic M, Balint B, Andjelic B, Stanisavljevic D, Kurtovic NK, Radisavljevic Z, et al. Outcome prediction of advanced mantle cell lymphoma by international prognostic index versus different mantle cell lymphoma indexes: one institution study. *Med Oncol.* 2012;29(3):2212-9.
- 40 Katzenberger T, Petzoldt C, Höller S, Mäder U, Kalla J, Adam P, et al. The Ki67 proliferation indexes a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood.* 2006;107(8):3407.
- 41 Determann O, Hoster E, Ott G, Wolfram Bernd H, Loddenkemper C, Leo Hansmann M, et al. Ki-67 predicts outcome in advanced- stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-cd20 immunochemotherapy: results from randomized trial of European MCL Network and German Low-Grade Study Group (GLSG). *Blood.* 2008;111(4):2385-7.
- 42 Pott C, Hoster E, Delfau-Larue MH, Beldjord K, Böttcher S, Asnafi V, et al. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood.* 2010;115(16):3215-23.
- 43 McKay P, Leach M, Jackson R, Cook G, Rule S. Guidelines for the investigation and management of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2012;159(4):405-26.

- 44 Rosenbluth BD, Yahalom J. Highly effective local control and palliation of mantle cell lymphoma with involved-field radiation therapy (IFRT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;65(4):1185-91.
- 45 Vandenberghe E, De Wolf-Peeters C, Vaughan Hudson G, Vaughan Hudson B, Pittaluga S, Anderson L, et al. The clinical outcome of 65 cases of mantle cell lymphoma initially treated with non-intensive therapy by the British National Lymphoma Investigation Group. *Br J Haematol*. 1997;99(4):842-7.
- 46 Leitch HA, Gascoyne RD, Chhanabhai M, Voss NJ, Klasa R, Connors JM. Limited-stage mantle-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2003;14(10):1555-61.
- 47 Hoster E, Metzner B, Forstpointner R, Pfreundschuh M, Trümper L, Hallek L, et al. Autologous stem cell transplantation and addition of rituximab independently prolong response duration in advanced stage mantle cell lymphoma. [abstract] *Blood*. 2009;114(22):880. [Presented at 51<sup>st</sup> ASH Annual Meeting Abstracts; December 05 - 08, 2009; New Orleans, Louisiana].
- 48 Dreger P, Laport GG. Controversies in lymphoma: The role of Hematopoietic Cell Transplantation for Mantle-Cell lymphoma and Peripheral T cell lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(1 Suppl 1):100-7.
- 49 Gianni AM, Magni M, Martelli M, Di Nicola M, Carlo-Stella C, Pilotti S, et al. Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen). *Blood*. 2003;102(2):749-55.
- 50 Delarue R, Haioun C, Ribrag V, Brice P, Delmer A, Tilly H, et al. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Grouped'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2013;121(1):48-53.

- 51 Lenz G, Dreyling M, Hoster E, Wörmann B, Dührsen U, Metzner B, et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol*. 2005;23(9):1984-92.
  
- 52 Hermine O, Hoster E, Walewski J, Ribrag V, Brousse N, Thieblemont C, et al. Alternating courses of 3x CHOP and 3x DHAP plus rituximab followed by a high dose ARA-C containing myeloablative regimen and autologous stem cell transplantation (ASCT) increases overall survival when compared to 6 courses of CHOP plus rituximab followed by myeloablative radiochemotherapy and ASCT in mantle cell lymphoma: final analysis of the MCL Younger Trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network (MCL net). [abstract] *Blood*. 2012; 120(21):151. [Presented at 54<sup>th</sup> ASH Annual Meeting Abstracts; December 8-11, 2012, Atlanta, GA, USA]
  
- 53 Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Andersen NS, Pedersen LB, Jerkeman M, et al. Nordic Lymphoma Group. Long term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front line immunochemotherapy with an in-vivo purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by Nordic Lymphoma Group. *Blood*. 2008;112(7):2687-93.
  
- 54 Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Jerkeman M, Rätty R, Andersen NS, et al. Nordic Lymphoma Group. Nordic MCL2trial update: six years follow up after intensive immunochemotherapy for untreated mantle cell lymphoma followed by BEAM or BEAC + autologous stem cell support still very long survival but late relapses do occur. *Br J Haematol*. 2012;158(3):355-62.
  
- 55 Pott C, Hoster E, Beldjord K, Macintyre AE, Böttcher S, Asnafi V, et al. R-CHOP/R-DHAP compared to R-CHOP induction followed by high dose therapy with autologous stem cell transplantation induces higher rates of molecular remission in MCL: results of the MCL Younger Intergroup Trial of the European MCL Network. [abstract] *Blood*. 2010; 116(21):965. [Presented at 52<sup>th</sup> ASH Annual Meeting Abstracts; December 4–7, 2010, in Orlando, FL, USA].

- 56 Cohen BJ, Moskowitz C, Straus D, Noy A, Hedrick E, Zelenetz A. Cyclophosphamide/fludarabine (CF) is active in the treatment of mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2001;42(5):1015-22.
- 57 Robinson KS, Williams ME, van der Jagt RH, Cohen P, Herst JA, Tulpule A, et al. Phase II multicenter study of bendamustine plus rituximab in patients with relapsed indolent B-cell and mantle cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(27):4473-9.
- 58 Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Trneny M, Geisler CH, et al. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2012;367(6):520-31.
- 59 Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, Banat GA, von Grünhagen U, Losem C, et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2013;381(9873):1203-10.
- 60 Flinn IW, van der Jagt R, Kahl BS, Wood P, Hawkins TE, MacDonald D, et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. *Blood*. 2014;123(19):2944-52.
- 61 Foran JM, Rohatiner AZ, Cunningham D, Popescu RA, Solal-Celigny P, Ghielmini M, et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol*. 2000;18(2):317-24.
- 62 Meusers P, Engelhard M, Bartels H, Binder T, Fülle HH, Görg K, et al. Multicentre randomized therapeutic trial for advanced centrocytic lymphoma: anthracycline does not improve the prognosis. *Hematol Oncol*. 1989;7(5):365-80.

- 63 Dietrich S, Boumendil A, Finel H, Avivi I, Volin L, Cornelissen J, et al. Outcome and prognostic factors in patients with mantle-cell lymphoma relapsing after autologous stem-cell transplantation: a retrospective study of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Ann Oncol.* 2014;25(5):1053-8.
- 64 Zucca E, Roggero E, Pinotti G, Pedrinis E, Cappella C, Venco A, et al. Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol.* 1995;6(3):257-62.
- 65 Robak T, Huang H, Jin J, Zhu J, Liu T, Samoilova O, et al. Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2015;372(10):944-53.
- 66 Rule S. Bortezomib-based chemotherapy in mantle-cell lymphoma. *Lancet Oncol.* 2018;19(11):1419-21.
- 67 Hess G, Smith SM, Berkenbilt A, Coiffier B. Tensirolimus in mantle-cell lymphoma and other non-Hodgkin's lymphoma subtypes. *Semin Oncol.* 2009;36(suppl 3): S37-S45.
- 68 Hofermann TM, Lossos IS, Justice G, Vose JM, Wiernik PH, Kyle M, et al. Lenalidomide oral monotherapy produces a high response in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2009;145(3):344-9.
- 69 Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Targeting BTK with Ibrutinib in relapsed or refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2013;369(6):507-16.
- 70 Ribatti D, Tamma R. A revisited concept: tumors: wounds that do not heal. *Crit Rev Onco/Hematol.* 2018;128: 65-9.
- 71 Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):422-33.
- 72 Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008;358(19):2039-49.

- 73 Dvorak HF. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol.* 2003;162(6):1747-57.
- 74 Weinberg RA. The biology of cancer. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Garland & Science; 2014. Capítulo 12, p.577-640
- 75 Nagy JA, Chang SH, Dvorak AM, Dvorak HF. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer.* 2009;100(6):865-9.
- 76 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
- 77 Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling-in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):359-71.
- 78 Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005;307(5706):58-62.
- 79 Tzankov A, Heiss S, Ebner S, Sterlacci W, Schaefer G, Augustin F, et al. Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. *J Clin Pathol.* 2007;60(5):476-82.
- 80 Ribatti D, Vacca A. New insights in anti-angiogenesis in multiple myeloma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7): E2031.
- 81 Brandvold KA, Neiman P, Rudell A. Angiogenesis is an early event in the generation of myc-induced lymphomas. *Oncogene.* 2000;19(23):2780-5.
- 82 Ribatti D, Vacca A, Bertossi M, De Benedictis G, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis induced by B-cell non-Hodgkin's lymphomas. Lack of correlation with tumor malignancy and immunologic phenotype. *Anticancer Res.* 1990;10(2A):401-6.
- 83 Ribatti D, Vacca A, Nico B, Fanelli M, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas: an immunohistochemical and ultrasound study. *Eur J Haemathol.* 1996;56(1-2):45-53.

- 84 Passalidou E, Stewart M, Trivella M, Steers G, Pillai G, Dogan A, et al. Vascular patterns in reactive lymphoid tissue and in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*. 2003;88(4):553-9.
- 85 Arias V, Soares FA. Vascular density (tumor angiogenesis) in non-Hodgkin's lymphomas and florid follicular hyperplasia: a morphometric study. *Leuk Lymphoma*. 2000;40(1-2):157-66.
- 86 Hazar B, Paydas Z, Zorludemir S, Sahin B, Tuncer I. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(12):2089-93.
- 87 Bairey O, Zimra Y, Kaganovsky E, Shaklai M, Okon E, Rabizadeh E. Microvessel density in chemossensitive and chemoresistant diffuse large B-cell lymphomas. *Med Oncol*. 2000;17(4):314-8.
- 88 Ganjoo KN, An CS, Robertson MJ, Gordon LI, Sen JA, Weisenbach J, et al. Rituximab, bevacizumab and CHOP(RA-CHOP) in untreated diffuse large B-cell lymphoma: safety, biomarker and pharmacokinetics analysis. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(6):998-1005.
- 89 Ruan J, Hyjek E, Kermani P, Christos PJ, Hooper AT, Coleman M, et al. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(19):5622-31.
- 90 Jorgensen JM, Sorensen JB, Bendix K, Nielsen JL, Olsen ML, Funder AM, et al. Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinic-pathological correlation and prognostic significance in specific subtypes. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(3):584-95.
- 91 Koster A, van Krieken JH, Mackenzie MA, Shraders M, Borm GF, van der Laak JAWM, et al. Increased vascularization predicts favourable outcome in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(1):154-61.

- 92 Salven P, Orpona A, Teerenhovi L, Joensuu H. Simultaneous elevation in the serum concentration of angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma: a single institution study of 200 patients. *Blood*. 2000;96(12):3712-8.
- 93 Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Yoshiro T, Tamaru J, Nakamura S, et al. Simultaneous elevation of the serum concentration of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*. 2002;68(2):91-100.
- 94 Aref S, Mabed M, Zalata K, El Askalany H. The interplay between c-Myc oncogene expression and circulating vascular endothelial growth factor (sVEGF), its antagonist receptor Flt-1 in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): relationship to patient outcome. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(3):499-506.
- 95 Foss HD, Araujo I, Demel G, Klotzbach H, Hummel M, Stein H. Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. *J Pathol*. 1997;183(1):44-50.
- 96 Chen H, Treewecke AT, West DC, Till KJ, Cawley JC, Zuzel M, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2000;96(9):3181-7.
- 97 Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, Howell KH, Geyer SM, Dewald GW, et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro and anti-angiogenic molecules. *Leukemia*. 2002;16(5):911-9.
- 98 Doussis-Anagnostopoulou A, Talks KL, Turley H, Debnam P, Tan DC, Mariatos G, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by Hodgkin-Reed-Sternberg cell in Hodgkin's disease. *J Pathol*. 2002;197(5):677-683.
- 99 Seymour JF, Preudschuh M, Trneny M, Sehn L, Catalano J, Csinsky E, et al. R-CHOP with or without bevacizumab in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma: final MAIN study outcomes. *Haematologica*. 2014;99(8):1342-9.

- 100 Vockova P, Klanova M, Mplinski J, Tuskova D., Maswabi BC, Jaksa R, et al. Role of angiogenesis and anti-angiogenic treatment strategies in Mantle Cell Lymphoma. [abstract] *Blood*. 2018;132(suppl 1):1672. [Presented at 60<sup>th</sup> ASH Annual Meeting Abstracts, December 1-4, 2018; San Diego, California, USA]
- 101 Petrakis G, Veloza L, Clot G, Gine E, Gonzales-Farre B, et al. Increased tumor angiogenesis in SOX-11 positive mantle cell lymphoma. *Histopathology*. 2019;75(5):704-14.
- 102 Zaja F, De Luca S, Vitolo U, Orsucci L, Levis A, Salvi F, et al. Salvage treatment with Lenalidomide and Dexametasone in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: clinical results and effects on microenvironment and neo-angiogenic biomarkers *Haematologica*. 2012;97(3) 416-22.
- 103 Lausen B, Schumacher M. Maximally selected rank statistics. *Biometrics*. 1992;48(1):73-85.
- 104 Schoenfeld D. Partial residuals for the proportional hazards regression model. *Biometrika*. 1982;69:239-41.
- 105 Grambsch PM, Therneau TM. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika*. 1994;81(3):515-26.
- 106 Tam CS, Anderson MA, Pott C, Agarwal R, Handunnetti S, Hicks RJ, et al. Ibrutinib plus Venetoclax for the treatment of mantle cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1211-23.
- 107 Jain P, Romaguera J, Srouf SA, Lee HJ, Hagemester F, Westin J, et al. Four year follow up of a single arm, phase II clinical trial of Ibrutinib plus Rituximab (IR) in patients with relapsed/ refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Br J Haematol*. 2018;182(3):404-11.
- 108 Raty R, Transsila K, Joensuu H, Teerenhovi L, Elonen E. Ki-67 expression level, histological subtype and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2002;69(1):11-20.

- 109 Samaha H, Domontet C, Ketterer N, Moullet I, Thieblemont C, Bouafia F, et al. Mantle cell Lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia*. 1998;12(8):1281-7.
- 110 Andersen NS, Jensen MK, de Nully-Brown P, Geissler CH. A Danish population-based analysis of 105 mantle cell lymphoma patients: incidences, clinical features, responses, survival and prognostic factors. *Eur J. Cancer*. 2002;38(3):401-8.
- 111 Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Teymoortash A, Siebmann JU, Janssen D, et al. Topoisomerase II alpha expression in Mantle Cell Lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor of clinical outcome. *Leukemia*. 2004;18(7):1200-6.
- 112 Oinonen R, Franssila K, Teerenhovi L, Lappalainen K, Elonen E. Mantle cell lymphoma: clinical features, treatment and prognosis of 94 patients. *Eur J Cancer*. 1998;34(3):329-36.
- 113 Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997;89(6):2067-78.
- 114 Weisenburger DD, Vose JM, Greiner TC, Greiner TC, Lynch JC, Chan WC, et al. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 68 cases from Nebraska Lymphoma Study Group. *Am J Hematol*. 2000;64(3):190-6.
- 115 Decaudin D, Bosq J, Munck JN, Bayle C, Koscielny S, Boudjemaa S, et al. Mantle cell lymphoma characteristics, natural history and prognostic factors of 45 cases. *Leuk Lymphoma*. 1997;26(5-6):539-50.
- 116 Valders GA, Klui-Nelemans JC, De Boer CJ, Hermans J, Noordijk EM, Schuurin E, et al. Mantle cell lymphoma: a population-based clinical study. *J Clin Oncol*. 1996;14(4):1269-74.
- 117 Hingot V, Errico C, Heiles B, Rahal L, Tanter M, Couture O. Microvascular flow dictates the compromise between spatial resolution and acquisition time in ultrasound localization microscopy. *Sci Rep*. 2019;9(1):2456.

- 118 Demidov V, Maeda A, Sugita M, Madge V, Sadanand S, Ilueraru C, Vitkin A. Pre-clinical longitudinal imaging of tumor microvascular radiobiological response with functional optical coherence tomography. *Sci Rep.* 2018;8(1):38.
- 119 Kennel P, Teyssedre L, Colombelli J, Plourabue F. Toward quantitative three-dimensional microvascular networks segmentation with multi view light sheet fluorescent microscopy. *J Biomed Opt.* 2018;23(8):1-14.

**Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP**



**A.C. Camargo  
Cancer Center**

**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

## **APROVAÇÃO**

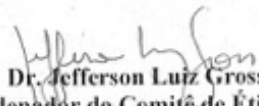
Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **01/11/2016**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **09/08/2016**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2245/16** intitulado: **“Análise da microdensidade vascular e sua correlação com o prognóstico do linfoma de células do manto”**.

**Pesquisador responsável: Dr. Fernando Augusto Soares.**  
**Aluno: Sérgio Augusto Buzian Brazil (Doutorado).**

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).**

São Paulo, 03 de novembro de 2016.

Atenciosamente,

  
**Dr. Jefferson Luiz Gross**

**1º. Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

I/I

## Anexo 2 - Estadiamento Ann Arbor

| Estádio                  | Área Envolvida                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I                        | Uma única região linfonodal envolvida                                                                                                                                                                          |
| IE                       | Comprometimento de um único órgão ou sítio extralinfático                                                                                                                                                      |
| II                       | Dois ou mais regiões linfonodais acometidas do mesmo lado do diafragma                                                                                                                                         |
| IIE                      | Comprometimento localizado de um único órgão ou sítio extralinfático e um ou mais regiões linfonodais do mesmo lado do diafragma                                                                               |
| III                      | Comprometimento de regiões linfonodais de ambos os lados do diafragma                                                                                                                                          |
| IIIE                     | Comprometimento de regiões linfonodais de ambos os lados do diafragma acompanhado de comprometimento localizado de um órgão ou sítio extralinfático                                                            |
| V                        | Comprometimento difuso de um ou mais órgãos extralinfáticos com ou sem envolvimento linfonodal<br>Comprometimento de um único órgão ou sítio extralinfático com acometimento de região linfonodal não regional |
| Qualificações Adicionais |                                                                                                                                                                                                                |
| A                        | Ausência de sintomas sistêmicos*                                                                                                                                                                               |
| B                        | Presença de sintomas sistêmicos                                                                                                                                                                                |
| X                        | Doença bulk , definida como massa nodal maior que 7,5cm em diâmetro maior ou massa mediastinal >1/3mdo diâmetro interno do tórax em raio-X PA                                                                  |
| E                        | Comprometimento extra-linfático localizado                                                                                                                                                                     |
| S                        | Comprometimento esplênico                                                                                                                                                                                      |

\* Sintomas sistêmicos:

- perda de peso sem causa aparente de  $\geq 10\%$  do peso corporal em 3 meses
- sudorese noturna
- febre vespertina – temperatura axilar  $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$

### Anexo 3 - ECOG

|   |                                                                          |
|---|--------------------------------------------------------------------------|
| 0 | Atividade Normal                                                         |
| 1 | Sintomático mas requer cuidados ambulatoriais                            |
| 2 | Cuidados ambulatoriais em >50% do tempo                                  |
| 3 | Cuidados ambulatoriais <50% do tempo. Cuidados de enfermagem necessários |
| 4 | Restrito ao leito. Necessita internação                                  |

## **Anexo 4 - Critérios de Resposta**

**1999** - Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B., et al. JCO 1999;17:1244-1253

### **Remissão Completa (RC)**

Desaparecimento de todas as evidências detectáveis de doença à Tomografia Computadorizada (TC) de todos os sintomas relacionados à doença.

Normalização de todas as alterações bioquímicas e de biópsia de medula óssea

Linfonodos com > de 1,5 cm em seu maior eixo deve regredir para < 1,5 cm. Linfonodos com 1,1-1,5 cm devem regredir para < 1,0 cm

### **Remissão Completa indeterminada (RC ind)**

Corresponde aos critérios de RC mas com massa residual > 1,5 cm em seu maior eixo tendo regredido pelo menos 75% de seu tamanho antes do tratamento.

### **Remissão Parcial (RP)**

Pelo menos 50% de redução na soma dos diâmetros das 6 maiores massas sem que ocorra aumento no tamanho de qualquer outro linfonodo.

Baço e fígado devem regredir pelo menos 50% de seu tamanho anterior ao tratamento se previamente comprometidos.

Biópsia de medula óssea é irrelevante

### **Doença Progressiva (DP)**

Mais de 50% de aumento na soma dos diâmetros de quaisquer linfonodos comprometidos ou aparecimento de qualquer nova lesão durante ou ao término do tratamento.

### **Recidiva**

Aparecimento de qualquer nova lesão ou aumento > 50% de linfonodos previamente comprometidos em pacientes que se encontravam em RC ou RCind

### **Remissão Completa (RC)**

Desaparecimento de todas as evidências detectáveis de doença à Tomografia Computadorizada (TC), de todos os sintomas relacionados à doença bem como normalização de todas as alterações bioquímicas e de biópsia de medula óssea

Em pacientes sem PET scan/FDG PET pré-tratamento ou com PET scan/FDG-PET positivo antes do tratamento, uma massa residual de qualquer tamanho pode estar presente desde que PET scan/FDG-PET seja negativa.

Em pacientes sem PET scan/FDG PET pré tratamento ou se PET scan/FDG PET pré tratamento for negativo, todos os linfonodos devem voltar ao normal. Linfonodos com > de 1,5 cm em seu maior eixo deve regredir para < 1,5 cm. Linfonodos com 1,1-1,5 cm devem regredir para < 1,0 cm.

Baço e/ou fígado, se considerados aumentados antes do início do tratamento através do exame físico ou TC, não devem ser mais palpáveis ao exame físico e devem ser considerados de tamanho normal nos exames de imagem.

Com relação ao Baço: avaliação deve ser cautelosa pois baço de tamanho normal pode estar comprometido por linfoma, enquanto baço aumentado pode ser resultado de variação anatômica, uso de GCSF ou outras causas que não linfoma

### **Remissão Completa indeterminada (RC ind)**

Sem necessidade.

### **Remissão Parcial (RP)**

Pelo menos 50% de redução na soma dos diâmetros das 6 maiores massas sem que ocorra aumento no tamanho de qualquer outro linfonodo.

Nenhum linfonodo, nem Baço nem Fígado devem aumentar

Baço e fígado devem regredir pelo menos 50% de seu tamanho anterior ao tratamento se previamente comprometidos. Nódulos hepáticos ou esplênicos devem regredir pelo menos 50% na soma dos diâmetros ou, se nódulo único, em seu maior eixo

Nenhum outro linfonodo deve ser observado em nenhum outro local, nem sinal de novo comprometimento de fígado e/ou baço

Biópsia de medula óssea é irrelevante se positiva antes do tratamento, porém deve ser especificado o tipo de comprometimento. Pacientes que atingiram RC e apresentam medula óssea comprometida ou não reavaliada, devem ser consideradas em RP

Para pacientes com PET scan/FDG PET positivo pré tratamento ou sem PET scan/FDG PET, este deve ser positivo em pelo menos um local previamente acometido

Para paciente com PET scan/FDG PET desconhecido ou negativo antes do tratamento, considerar critérios de TC

### **Doença Progressiva (DP) – após RP**

#### **Recidiva- após RC**

Linfonodos devem ser considerados anormais se seu maior eixo medir  $> 1,5$  cm. Se em seu maior eixo a medida for 1,1-1,5 ele deve ser considerado anormal se seu menor eixo for maior do que 1,0 cm

Surgimento de qualquer novo linfonodo maior que 1,5 cm em qualquer eixo durante ou após o término da quimioterapia, mesmo que outros linfonodos tenham regredido de tamanho.

Se em PET scan/FDG houver qualquer aumento de captação em região previamente não acometida a confirmação de recidiva/progressão de doença só poderá ser feita através de biópsia.

Pelo menos 50% de aumento do nadir da soma dos diâmetros de linfonodos ou de outros locais (Baço/ Fígado) comprometidos.

Para ser considerado doença progressiva, o linfonodo deve aumentar  $\geq 50\%$  em seu menor ou maior eixo

Doença extra-nodal deve ser avaliada como doença nodal. Considerar Baço como doença nodal. Lesões tipos serosites ou ósseas só serão classificadas como presentes ou ausentes a não ser que haja comprovação histológica.