

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DAS
SINTASES DO ÓXIDO NÍTRICO, PROTEÍNA p53 E
CICLOXIGENASE-2 EM HIPERPLASIAS LINFÓIDES
DE PADRÃO FOLICULAR E EM LINFOMAS
NÃO-HODGKIN FOLICULARES**

ANA MARIA DA CUNHA MERCANTE

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

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

**São Paulo
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Cunha Mercante, Ana Maria da

O estudo imunoistoquímico da expressão das sintases do óxido nítrico, proteína p53 e cicloxigenase-2 em hiperplasias linfóides de padrão folicular e em linfomas não-Hodgkin foliculares / Ana Maria da Cunha Mercante -- São Paulo, 2006.

56p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. LINFOMA NÃO-HODGKIN. 2. LINFOMA FOLICULAR. 3. HIPERPLASIA LINFÓIDE REATIVA. 4. PROTEÍNA p53. 5. IMUNOHISTOQUÍMICA. 6. ÓXIDO NÍTRICO. 7. SINTASE DE ÓXIDO NÍTRICO.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, PEDRO PRIMO DA CUNHA, pelos ensinamentos que norteiam minha vida e a minha mãe, IZABEL MARIA DA CUNHA, pelo incentivo em estudar, a eles o meu muito obrigada pela participação no meu desenvolvimento como ser humano.

Ao meu marido, CARLOS ALBERTO MERCANTE, pelo incentivo ao meu crescimento profissional e ao ombro amigo nas horas mais difíceis.

À minha filha, CAROLINA DA CUNHA MERCANTE, que concede o privilégio da maternidade e por ser um estímulo para superar as pedras no meu caminho.

Ao meu professor, Dr. FERNANDO AUGUSTO SOARES, pela paciência e dedicação ao meu aprendizado em mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao corpo docente e à secretaria da pós-graduação pela dedicação e incentivo aos alunos.

Aos membros da Banca de Qualificação pelas críticas e sugestões que em muito contribuíram para o andamento deste estudo, em especial a Dra. Adriana Abalen Martins Dias.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer, em especial aos biólogos José Ivanildo Neves e Fabiana Facco Casarotti, ao arquivista Marcelo Augusto Sibucks e à secretária Alexandra Cardozo Longo, pela eficiência e dedicação.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa do Instituto Ludwig, em especial ao Carlos Ferreira Nascimento e a Suely Nonogaki, pelo apoio técnico.

Às funcionárias da Biblioteca, em especial à bibliotecária Suely Francisco, pelo auxílio na revisão bibliográfica e formatação deste estudo.

Aos colegas do departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami, Dr. Antônio Hugo F. M. Campos, Dra. Cynthia A. Bueno de Osório e Dra. Isabela Werneck da Cunha, muito obrigada.

Aos colegas da pós-graduação pelo companheirismo.

Ao Dr. José Humberto Fregnani pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Mercante AMC. **O estudo imunoistoquímico da expressão das sintases do óxido nítrico, proteína p53 e ciclooxigenase-2 em hiperplasias linfóides de padrão folicular e em linfomas não-Hodgkin folicular.** São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: O óxido nítrico (NO) pode induzir a apoptose. A expressão das três isoformas de sintase do óxido nítrico (NOS) é descrita em várias neoplasias, inclusive nos linfomas de células B. A apoptose é um dos mecanismos reguladores da proliferação do centro germinativo. E a inibição da apoptose é o principal defeito molecular dos linfomas foliculares (LF). Algumas das ações do NO é a estimulação da produção de COX2 e o acúmulo da proteína p53. As NOS são expressas nos LF, mas não há dados na literatura sobre a expressão das NOS nas hiperplasias foliculares (HF). O presente trabalho compara a expressão de NOS1, NOS2, NOS3, p53 e COX2 em HF e LF com o objetivo de entender a sua participação nos dois processos patológicos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram confeccionados dois blocos de *array*, com cores de 1mm, amostrados em duplicata de 90 casos de LF e 137 casos de HF, respectivamente. Foi realizada a imunoistoquímica em lâminas duplicadas utilizando-se os anticorpos anti-NOS1 -NOS2, -NOS3, -p53 e -COX2. Os resultados foram interpretados de acordo com a intensidade da reação (negativa=0; fraca=1; moderada=2; forte=3) e número de células coradas (<1%=0; 1%-10%=1; 11%-50%=2; 50%-90%=3, maior que 90%=4). Os resultados individuais (intensidade e frequência) foram multiplicados. Seguido do cálculo da média dos resultados das quatro observações. As médias obtidas foram categorizadas como se segue: 0- 5= negativo e maior que 5,1= positivo. Os resultados foram comparados utilizando o teste do qui-quadrado de *Pearson* e o teste exato de *Fisher*. **RESULTADOS:** Na estatística descritiva, observou-se que a frequência de marcação da expressão das três isoformas de NOS foi maior nas HF (NOS1 c= 86,9%, NOS1 n= 94,2%, NOS2= 88,9%, e NOS3= 91,1%), que nos LF (NOS1 c= 75,0%, NOS1 n= 72,7%, NOS2= 17,8%,

e NOS3= 78,7%). O p53 foi positivo em 64,4% dos LF, em contrapartida, apenas 6,7% das HF foram positivas para esse antígeno. Observou-se ainda, a associação entre os grupos (LF e HF), segundo cada uma das três isoformas de NOS (NOS1 c*, NOS1 n**, NOS2**, NOS3***), p53**, exceto para o COX2 ($p=0.088$). Não se evidenciou associação entre os antígenos: NOS2 e COX2 ($p= 1.0$); p53 e COX2 ($p= 0.343$); p53 e NOS2 ($p= 0.692$) para o grupo dos LF, NOS2 e COX2 ($p= 0.215$); p53 e NOS2 ($p= 0.597$) para o grupo das HF. Há associação apenas entre os antígenos p53 e COX2 ($p= 0.015$) no grupo das HF. **CONCLUSÕES:** Os resultados do presente trabalho mostram um predomínio na frequência de expressão das isoformas de NOS nas HF. Considerando que os mecanismos de apoptose estão ativados nas HF e inibidos nos LF. Logo, a produção do NO, pelo aumento da frequência de expressão de NOS nas HF, deve estar associada à estimulação do mecanismo de morte celular do centro germinativo ativado das HF. Há relação inversa da frequência da expressão de NOS2 e p53 nas HF, enquanto que nos LF a expressão da p53 está aumentada, sugerindo que o NO possa participar na patogênese do LF. A não-associação ($p<0.05$) entre os antígenos (NOS2 com p53 ou COX2) corrobora, conforme dados da literatura, em que a ação de NO pode ser tipo celular dependente.

* $p=0.023$, ** $p<0.0001$, *** $p=0.008$, **** $p=0.088$, ***** $p<0,0001$.

SUMMARY

Mercante AMC. [The immunohistochemistry study of the expression of the nitric oxide synthases, cyclooxygenase-2, p53 protein in follicular lymphoid hyperplasia and in follicular non-Hodgkin's lymphomas]. São Paulo; 2005. [Dissertação do Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: The nitric oxide (NO) can introduces apoptosis. The expression of the three isoforms of nitric oxide (NOS) is described in several cancers, as well as in B cell lymphomas. The apoptosis is one of the regulators mechanisms of the proliferation in the reactive germinal center and the inhibition of apoptosis is the main molecular defect of the follicular lymphoma (HF). Some of the multiple action of NO is the stimulation of production of COX2 and accumulation of p53 protein. The NOS are expressed in the HF, but there aren't any data in the literature about the NOS expression in HF. The present study compares the expression of NOS1, NOS2, NOS3, p53 and COX2 in HF and LF in order to understand its participation in the two pathological processes. **MATERIAL AND METHODS:** Two blocks of array had been manufactured with cores of 1mm, shown in duplicate of 90 cases of LF and 137 cases of HF, respectively. The immunohistochemistry was done in slides in duplicate using the antibodies anti-NOS1, -NOS2, -NOS3, -p53, -COX2. The results had been interpreted according to the intensity of the reaction (negative=0, weak=1, moderate=2, strong=3) and the number of staining cell (<1%=0, 1-10%=1, 11-50%=2, 59-90%=3 and bigger than 90%=4). The individual results were multiplied. Followed by the calculus, of average of the results in the four observations. The average was then categorized as the following: 0-5= negative and bigger than 5,1= positive. The anti-p53 antibody was interpreted as positive when one of

the four observations with over than 10% of positive cells. The results were compared using the Pearson's chi-square test and Fisher's exact test. **RESULTS:** In the descriptive statistics, it was observed that the frequency of staining of the expression of the three isoforms of nitric oxide, was bigger in the HF (NOS1 c= 86, 9%, NOS1 n= 94, 2%, NOS2= 88, 9%, e NOS3= 91,1%) than in the LF (NOS1 c= 75,0%, NOS1 n= 72,7%, NOS2= 17,8%, e NOS3= 78,7%). The p53 was positive in 64, 4% of the LF, but, on the other hand, only 6.7% of the HF had been positive for this antigen. It was also observed, the association between the groups (LF and HF), according to each one of the three NOS isoforms (NOS1 c *, NOS1 n **, NOS2 **, NOS3 ***), p53 **, except for the COX2 (p=0.088). The association between antigens was not evident: NOS2 and COX2 (p = 1, 0); p53 and COX2 (p = 0,343); p53 and NOS2 (p = 0,692) for the LF group, NOS2 and COX2 (p = 0,215); p53 and NOS2 (p = 0,597) for the HF group. There is association only between the antigens p53 and COX2 (p = 0, 0015) in the HF group. **CONCLUSION:** The results of the present study, have shown that some predominance in the frequency of expression of NOS isoforms. It influence in production of NO. Considering that the mechanism of apoptosis are activated in the HF and inhibited in the LF. These data lend support that the NO/NOS might be associated to the stimulation of mechanism of cellular death of the activated germinal center of the HF. There is inverse relation of frequency of the NOS2 and p53 expression in HF, whereas in the LF the p53 expression is increased, suggesting that the NO can take part in pathogenesis of follicular lymphoma. The not-association between the antigens (NOS2 with p53 or COX2) agree with data of literature, where the action of NO might be dependent cellular type.

*p=0.023, **p<0.0001, ***p=0.008, ****p=0.088, *****p<0,0001.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Demonstrando arranjo arquitetural folicular > 75% no LF	23
Figura 2A	Tonsila faríngea	23
Figura 2B	Demonstrando centro germinativo hiperplásico da tonsila faríngea	23
Figura 3 A	Demonstrando foto da lâmina corada pela H.E. do bloco de <i>array</i> de linfoma folicular	24
Figura 3 B	Demonstrando foto da lâmina corada pela H.E. do bloco de <i>array</i> de hiperplasia folicular (H&E)	24
Figura 4	Demonstrando marcação IQ nuclear e citoplasmática da NOS1. A - Hiperplasia Folicular. B - Linfoma Folicular.	32
Figura 5	Demonstrando o padrão de marcação IQ citoplasmática granular da NOS2 A - Hiperplasia Folicular. B - Linfoma Folicular.	33
Figura 6	Demonstrando o padrão de marcação IQ nuclear e citoplasmática da NOS3 A - Hiperplasia Folicular. B - Linfoma Folicular.	34
Figura 7	Demonstrando o padrão de marcação IQ citoplasmática da <i>cox2</i> A - Hiperplasia Folicular. B - Linfoma Folicular.	35
Figura 8	Demonstrando o padrão de marcação IQ nuclear da p53 (aumento original de 200X). A - Hiperplasia Folicular.	

Figura 9 - Demonstrando o negatividade da marcação IQ para NOS2 **A** -
Hiperplasia Folicular (aumento original de 400X). **B** - Linfoma
Folicular(aumento original de 1000X).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultado geral dos antígenos	29
Tabela 2	Resultados das análises da associação entre NOS2 e COX2 no grupo dos Linfomas Foliculares.	30
Tabela 3	Resultados das análises da associação entre p53 e NOS2 no grupo dos Linfomas Foliculares.	30
Tabela 4	Resultados das análises da associação entre p53 e COX2 no grupo dos Linfomas	30
Tabela 5	Resultados das análises da associação entre NOS2 e COX2 no grupo das Hiperplasias Linfóides de padrão folicular.	30
Tabela 6	Resultados das análises da associação entre p53 e COX2 no grupo das Hiperplasias Linfóides de padrão folicular.	31
Tabela 7	Resultados das análises da associação entre p53 e NOS2 no grupo das Hiperplasias Linfóides de padrão folicular.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

APAF-1	Fator ativador de proteases-1
bcl2	oncoproteína bcl2 humana
CG	centro germinativo
CMA	campo de maior aumento
cox2	cicloxigenase-2
dATP	adenosina trifosfato
DR	Receptor de morte (do inglês <i>Death Receptor</i>)
FAAD	Proteína associada ao domínio de morte (do inglês <i>associated death domain protein</i>)
FAS	(do inglês <i>fibroblast-associated cell surface</i>)
FAS-L	ligante do receptor FAS
HF	Hiperplasia linfóide de padrão folicular
Ig	imunoglobulina
IQ	imunoistoquímica
LF	Linfoma Folicular
NOS	Sintase de óxido nítrico (do inglês <i>Nitric Oxide Synthases</i>)
NOS1 c	Sintase de óxido nítrico 1 marcação citoplasmática
NOS1 n	Sintase de óxido nítrico 1 marcação nuclear
NO	Óxido Nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	proteína p53
SMAC	(do inglês <i>spinal muscular atrophy protein</i>)
TNF	fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

<	menor que
>	maior que
=	igual a
p	valor estatístico
%	porcentagem

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Hiperplasia folicular	1
1.2	Linfoma folicular	3
1.3	Apoptose	5
1.3.1	Família bcl-2	7
1.3.2	Proteína p53	9
1.3.3	Ciclooxigenase2	10
1.3.4	Óxido nítrico e suas sintases	11
1.3.5	Correlação entre sintases do óxido nítrico e COX2	13
1.3.6	Considerações	14
2	OBJETIVOS	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Casuística	17
3.2	Confecção do <i>Tissue Macroarray</i>	18
3.3	Imunoistoquímica	19
3.4	Análise estatística	21
4	RESULTADOS	24
4.1	Resultados das freqüências da expressão dos marcadores imunoistoquímicos nos Linfomas Foliculares	24
4.2	Resultados das freqüências da expressão dos marcadores imunoistoquímicos nas Hiperplasias Linfóides de Padrão Folicular	25
4.3	Resultados das análises de associação entre os grupos Linfomas Foliculares e Hiperplasias Linfóides de Padrão Folicular segundo cada antígeno	26
4.4	Resultados das análises de associação entre dois marcadores imunoistoquímicos distintos no grupo dos Linfomas Foliculares	27

4.5	Resultados das análises de associação entre dois marcadores imunoistoquímicos distintos no grupo das Hiperplasias Linfóides de Padrão Folicular	27
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÕES	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1

INTRODUÇÃO

A hiperplasia folicular (HF) e o linfoma folicular (LF) são entidades que originam-se da mesma célula (centrocitos e centroblastos) presentes no centro germinativo (SOARES et al. 2000 e HARRIS 1999). Talvez isso possa justificar a semelhança morfológica entre as duas entidades, sendo o linfoma folicular o principal diagnóstico diferencial da hiperplasia folicular reativa (CHAN e TSANG 1996), apesar da grande diferença do ponto de vista molecular descrita nessa dissertação. Longe de ser um modelo de progressão tumoral, mas apresentando a apoptose como seu principal mecanismo na patogênese tanto da HF quanto do LF (VOUTSADAKIS (2000). Estas duas características mesmas células de origem e apoptose na patogênese, tornaram as duas entidades possíveis modelos de ações diferentes entre moléculas que participam da apoptose. Sabe-se que a apoptose é regulada por numerosas moléculas como o óxido nítrico, proteína p53 e ciclooxigenase2. O presente trabalho compara a expressão imunohistoquímica de NOS1, NOS2, NOS3, p53 e COX2 em HF e LF com o objetivo de entender a participação dessas moléculas nos dois processos patológicos, cujo mecanismo de apoptose faz-se presente.

1.1

HIPERPLASIA FOLICULAR

As linfadenopatias reacionais compreendem um grande grupo de

reações imunes do tecido linfóide a diversos estímulos. Essas podem ser de vários padrões morfológicos e definidos conforme o compartimento fisiomorfológico como foliculares, paracorticais, histiocitose sinusal, fibrosante, necrosante ou mista (SOARES et al. 2000). Talvez a resposta mais comum dos linfonodos à estimulação imune seja a formação de centros germinativos reacionais (fóliculos secundários) em um quadro conhecido como hiperplasia folicular. É nesse tipo de reação que haverá a maturação das células B para a produção das células de memória.

A formação do centro germinativo (CG) dos folículos reacionais tem sua fisiologia bem conhecida. Ocorrendo o contato com um antígeno, as células apresentadoras de antígenos estimulam a migração de células B virgens circulantes, via linfáticos aferentes, para os linfonodos loco-regionais. Inicia-se então o processo de formação do folículo linfóide secundário. Em um processo de duração aproximada de 72 horas, há a proliferação de células B. As células N *naive* se desdiferenciam em centroblastos, que se agregam em um dos pólos do CG para a formação da zona escura. Neste momento há também a proliferação de células T em grau menos intenso. Os centroblastos sofrem hipermutações somáticas quando passam a se diferenciar em centrocitos, que junto com as células dendríticas foliculares e as células T CD4+CD57- formam a zona clara do CG. As células dendríticas foliculares irão processar o antígeno e apresentá-las aos centrocitos, que serão diferenciadas em células B de memória. Quando ocorre a interação entre os centrocitos e as células T a produção de centroblastos diminui, levando a regressão do CG. Essa célula de memória caracteriza-se inicialmente pela expressão de imunoglobulina D (IgD), sofrendo uma

expansão clonal e migrando para a zona medular como imunoblastos e plasmócitos. Vale ressaltar que as células T ativadas ainda migrarão pelos linfáticos eferentes (SOARES et al. 2000). Nas etapas da formação e regressão dos centros germinativos os mecanismos da proliferação celular e apoptose têm um papel muito importante. Aquelas células B que não se diferenciam em células B de memória sofrem apoptose, iniciando o processo e regressão do CG.

A hiperplasia folicular é caracterizada morfológicamente por folículos de tamanhos e formas variadas, com zona do manto bem definida e separados por zonas interfoliculares facilmente identificadas. Os folículos são constituídos por população polimorfa de células, representados por centroblastos e centrócitos. Esses exibem distribuição polarizada no centro germinativo formando a zona clara e a zona escura, conforme já referido. Os macrófagos de corpo tingido, freqüentes figuras de mitoses e células apoptóticas são facilmente identificadas de permeio nos centros germinativos hiperplásicos.

O imunofenótipo característico é a ausência de expressão da oncoproteína bcl2 nos centros germinativos hiperplásicos (HARRIS 1999), onde o mecanismo de apoptose está ativado (VAN EIJK et al. 2001). A proteína bcl2 apresenta marcação positiva na zona do manto, a qual é representada por linfócitos maduros. Raramente observa-se essa positividade dentro do CG, esses casos podem ser explicados pela presença de células maduras nesta região (MUSIATOWICZ et al. 2003).

O linfoma folicular é o principal diagnóstico diferencial da hiperplasia folicular reativa. Em muitos casos, os quadros morfológico e citológico

permitem a diferenciação, porém em alguns casos somente o estudo imunoistoquímico e molecular podem distingui-los (CHAN e TSANG 1996).

1.2 LINFOMA FOLICULAR

Os linfomas foliculares são neoplasias de células B originadas no CG e são classificados em três categorias pela OMS (JAFFE et al. 2001; PAES et al. 2002). Essa entidade corresponde aos linfomas centrofoliculares da classificação REAL e é considerado um linfoma não-Hodgkin de baixo grau. Por definição são neoplasias de células B compostas por centrócitos e centroblastos, em sua maioria apresentam um padrão de crescimento predominantemente folicular (HARRIS 1999).

Clinicamente os linfomas foliculares são o tipo mais comum de linfomas não-Hodgkin no adulto, cuja maior ocorrência está entre 50 e 60 anos, sendo virtualmente inexistente antes dos 25 anos. A maior parte dos pacientes tem o diagnóstico tardio. Essa entidade apresenta evolução clínica caracterizada por períodos de remissão e recaída, com sobrevida variando de 7 a 10 anos, sendo o óbito em geral secundário a doença refratária ou a transformação para linfoma de alto grau de malignidade (PETERSON 1999; SOARES 2001).

O aspecto morfológico é caracterizado por composição celular polimorfa, com presença de centrócitos e centroblastos, formando arranjo arquitetural nodular (fóliculo) e áreas difusas com proporções variáveis (HARRIS 1999; NATWANI et al. 2001; SOARES 2001). Os centroblastos são células grandes não clivadas, com cromatina

vesiculosa, usualmente nucléolo pequeno localizado na periferia e rima de citoplasma basofílico. Os centrócitos são células menores clivadas com núcleo irregular alongado, cromatina dispersa e nucleólo inconspícuo, usualmente não se evidencia o citoplasma. Não há consenso entre os patologistas a respeito da melhor forma de classificar os linfomas foliculares. A técnica proposta por Mamm e Berard, citados por (HARRIS 1999, p.12.2) para a classificação dos linfomas foliculares é baseada na contagem dos centroblastos. Essa entidade pode ser classificada em três graus: grau I= 0 a 5 centroblastos/1campo de maior aumento (CMA), grau II= 6 a 15/CMA, grau III= maior que 15/CMA. A vantagem dessa classificação (contagem do número de células) é a maior reprodutibilidade quando comparada com o uso da proporção estimada. Mas algumas críticas referem-se ao método como tedioso e quando usado em diferentes microscópios, sem a devida correção, pode levar a classificação errônea.

O imunofenótipo característico, mas não absolutamente específico, é a ausência de marcação para o CD5 e, usualmente, de CD43 negativo. Frequentemente, observa-se expressão do marcador CD10. A grande maioria dos LF apresentam translocação t(14;18), que leva ao rearranjo do gene bcl2. Essa translocação pode ser demonstrada pela superexpressão imunoistoquímica da oncoproteína bcl2, contrastando com centros germinativos reativos que são bcl2-negativo (HARRIS 1999). A expressão da proteína bcl2 pode ser heterogênea, pois os centroblastos tendem serem negativos, enquanto que os centrócitos geralmente são positivos (FALINI e MASON 2002).

A oncoproteína bcl2 tem função anti-apoptótica, e

como consequência da sua superexpressão ocorre um aumento da sobrevivência das células neoplásicas do LF (VIARDOT et al. 2003). Vários estudos sugerem que na patogênese do LF é importante a inibição de apoptose dos centros germinativos (HOLLOWOOD e MACARTNEY 1991). No estudo comparativo de VOUTSADAKIS (2000), foram avaliados quantitativamente, centros germinativos de linfomas foliculares e hiperplasias foliculares reativas, observou-se que o índice de apoptose é maior nos folículos reativos que nos neoplásicos. Esses resultados confirmam que a redução da apoptose é um importante fator para a patogênese dos linfomas foliculares. Conclui-se com isso, que o mecanismo de apoptose encontra-se ativado na HF e inibido nos LF.

1.3 APOPTOSE

A apoptose é um tipo de morte celular de grande importância nas inúmeras funções biológicas fisiológicas e nos processos patológicos, como por exemplo, no câncer. A apoptose é caracterizada morfologicamente pelas alterações na estrutura celular como: retração celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, formação de bolhas citoplasmáticas com posterior fragmentação da célula e por fim a formação de corpos apoptóticos (GESKE e GERSCHENSON 2001).

Do ponto de vista molecular, a apoptose é o efeito final da ativação da cascata das caspases. As caspases são uma família de proteases intracelulares separadas em dois grupos com funções distintas: caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9, 10) e efetoras (caspases 3, 6 e 7). A

diferença entre elas é estrutural, sendo que as caspases iniciadoras têm pró-domínio N-terminal longo, enquanto que as efetoras têm este pró-domínio curto (REED 2001). As caspases são sintetizadas como pró-caspases, que para serem ativadas cuja ativação depende de reação proteolítica (WALKER et al. 1994). Há duas vias reguladoras principais da ativação da cascata das caspases. A primeira, conhecida como via de morte, representada pela superfamília do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), cujos principais elementos são o FAS (FAS, do inglês *fibroblast-associated cell surface*) e o ligante do receptor FAS (FASL). A segunda via é a mitocondrial, com várias proteínas com ações pró e anti-apoptose, cuja atividade é mediada através da liberação do citocromo C.

A via dos receptores de morte transmite sinais externos para o citoplasma através do ligante, que se acopla aos respectivos receptores da membrana. Estes receptores de membrana têm um domínio interno que é capaz de ligá-lo às proteínas adaptadoras, que por sua vez ativam as caspases. São conhecidos vários receptores de morte em humanos, sendo os principais: FAS, TNFR1, DR3, DR4, DR5 e DR6 (REED 2001; SCHULTZ e HARRINGTON 2003). Um dos exemplos fisiológicos mais bem estudados é a promoção da apoptose nos linfócitos T citotóxicos e células "natural-Killer". Essas células produzem o FASL, que associam se ao FAS na membrana. Este complexo formado tem um domínio de ligação para outra proteína chamada FAAD (do inglês *FAS-association death domain*). Finalmente, a formação desse complexo ativa a pró-caspase 8, iniciando a cascata das caspases. Esse é um mecanismo importante para o equilíbrio do sistema imunológico (REED 2000).

A via intrínseca ou mitocondrial é mediada pelo citocromo C, que é liberado pela mitocôndria em resposta a vários estímulos. Uma vez liberado no citoplasma, o citocromo C associa-se ao fator ativador de proteases-1 (Apaf1, do inglês *apoptosis protease activating factor-1*) e dATP, sendo este complexo o responsável pela ativação da caspase 9, desencadeando a ativação da cascata efetora da apoptose (REED 2000). Há trabalhos que sustentam a hipótese que a abertura do poro na membrana mitocondrial associa-se a diminuição da função da membrana e, por consequência, há influxo de fluido para o interior da membrana. Ocorrendo com isso, a ruptura da membrana mitocondrial e liberação de proteínas pró-apoptóticas (VANDER HEIDEN et al. 1997).

Na literatura há numerosos trabalhos (REED 2000 e 2001; VOUTSADAKIS 2000; NAKAGAWA et al. 2000; SUN et al. 2002; SCHULTZ e HARRINGTON 2003) que descrevem os mediadores químicos e que explicam os mecanismos pelos quais estas moléculas podem ativar ou inibir a cascata das caspases deflagrando a apoptose.

1.3.2 Família das proteínas bcl2

A família bcl2 é constituída por membros pro-apoptóticos (bak, bax, bad, bid, bcl-x, Noxa) e anti-apoptóticos (bcl-2, bcl-XL, bcl-w e bad) (SCHULTZ e HARRINGTON 2003). Essa família de proteínas é também chamada guardiã da mitocôndria e participa do controle da via intrínseca da apoptose.

O balanço entre as proteínas pró e anti-apoptóticas é o que determina o controle da via mitocondrial da apoptose

(REED 2000; VOUTSADAKIS 2000). Essas proteínas da família bcl2 estão localizadas na membrana mitocondrial externa (VOUTSADAKIS 2000), no retículo endoplasmático (NAKAGAWA et al. 2000) e nas membranas nucleares (NAHTA e ESTEVA 2003). A função dessas proteínas pode ser demonstrada na ação de membros anti-apoptóticos como o bcl2, podendo este prevenir esta liberação do citocromo C (SUN et al. 2002).

A superexpressão da proteína bcl2 pode ser observada em cerca de metade das neoplasias malignas (JAHRSDORFER et al. 2002). Nos tumores sólidos essa superexpressão ainda não tem seu mecanismo bem conhecido (NAHTA e ESTEVA 2003). Uma das hipóteses para explicar essa superexpressão seria a baixa função da p53, a qual é observada em mais da metade dos tumores sólidos (REED 1997). O gene *BCL2* é reprimido pela p53, a mutação do *Tp53* faz com que a p53 não reprima o gene *BCL2*, o que permite o aumento dos níveis celulares da proteína bcl2. Portanto, os altos níveis de bcl2 podem ser secundários ao efeito da mutação do *Tp53* (NAHTA e ESTEVA 2003). A outra hipótese da superexpressão da proteína bcl2 é a hipometilação do gene *BCL2*, como é observado em pacientes com leucemia linfocítica crônica (REED 1995). Nas neoplasias de células B a superexpressão da proteína bcl2 é explicada pela translocação do t(14; 18) na maioria dos casos (ONG et al. 1998; FALINI e MASON 2002). Nos LF esta translocação é encontrada em torno de 80- 90% (VIARDOT et al. 2003). A superexpressão bcl2 é considerada um importante fator relacionado à resistência de múltiplas drogas e refratariedade a quimioterapia (REED 1997; BONETTI et al. 1998; MANO et al. 1999; CONDON et al. 2002).

A expressão do bax também pode ser controlada pela proteína p53, uma de suas funções é ativar a transcrição de genes, como o *BAX*, gene envolvido na ativação da apoptose. Nos tumores, os quais a proteína p53 está mutada, a produção da proteína bax não é ativada (GESKE e GERSCHENSON 2001).

1.3.1 Proteína p53

Outro importante regulador da apoptose é a proteína p53. Esta proteína tem o papel bastante conhecido na carcinogênese humana (IGNEY e KRAMMER 2002), sendo que a mutação do *Tp53* é o evento genético mais comum nas neoplasias malignas (CHANG et al. 1993; GESKE e GERSCHENSON 2001; VOUSDEN e LU 2002). Esta proteína está envolvida também na inibição da proliferação celular (MORGAN et al. 2002). Camundongos *knockout*, para o *TP53*, apresentaram um desenvolvimento embriogênico e uma grande frequência de tumores (DONEHOWER et al. 1992). A atividade apoptótica da proteína p53 ocorre pela indução da transcrição de outros genes pró-apoptóticos, ou interagindo diretamente com algumas proteínas, como Apaf1 e caspase 9 (CAELLES et al. 1994; GESKE e GERSCHENSON 2001). Um dos genes que pode ser regulado pela p53 é o *BAX*, membro pró-apoptótico da família *BCL2* (ASHE e BERRY 2003; GESKE e GERSCHENSON 2001). Outro gene que tem sua transcrição influenciada pela proteína p53 é o gene *FAS* (GESKE e GERSCHENSON 2001).

Como citado anteriormente, a mutação do *TP53* é um dos eventos mais frequentes na tumorigênese humana (CHANG et al.

1993; GESKE e GERSCHENSON 2001; VOUSDEN e LU 2002). No entanto, a mutação da proteína p53 é um evento menos freqüente na tumorigenese das neoplasias hematológicas malignas, quando comparado com os tumores sólidos (SHAMINIE et al. 2005). A expressão IQ da proteína p53 pode ser independente da mutação do *TP53*, como foi observado em um estudo de 53 casos de linfomas de células B extranodal, sendo que 50% dos linfomas grau 1 expressaram a proteína p53 e apenas 33% apresentaram mutação do *TP53* (TAI et al. 2004). A proteína p53 também poder ser observada em condições benignas como nos CG hiperplásicos, cuja expressão não é sinônimo de malignidade, nem de mutação do *TP53*, todavia pode ser explicada pela relação da proteína p53 com a proliferação celular (MATEO et al. 1995). A proliferação celular está presente nos CG hiperplásicos (SOARES et al. 2000).

ICHIKAWA et al. (1993) relataram que em apenas 20% dos casos de Linfomas não-Hodgkin de células B, e aqueles com curso mais agressivo, apresentaram mutação deste gene. Dezessete casos de LF da Ásia foram analisados nesse estudo, sendo observado correlação positiva entre a mutação e a expressão do *TP53* nos casos LF transformados em alto grau (SHAMINIE et al. 2005).

1.3.3

Cicloxigenase 2

A cicloxigenase-2 (cox2) é uma enzima que participa da síntese das prostaglandinas, convertendo o ácido aracdônico em prostaglandina H₂ (SMITH et al. 2000). Uma de suas ações mais importantes está na inibição da apoptose, promovendo com isto o

crescimento tumoral (CAO e PRESCOTT 2002). Em modelos animais e em estudos *in vitro*, a cox2 participa na promoção do crescimento celular (KIMURA et al. 2000), na prevenção de apoptose (FONTEH et al. 2001) e no aumento da adesão e motilidade celular (DOHADWALA et al. 2001; SHENG et al. 2001). Há vários relatos na literatura da participação da cox2 na patogênese das neoplasias, incluindo câncer de estômago, cólon e linfomas de células B. TATSUGUCHI et al. (2004), estudando 107 adenocarcinomas gástricos, sugere que a cox2 contribui para o desenvolvimento do câncer gástrico, pois promove a angiogênese e inibi a apoptose. OSHIMA et al. (1996) relataram que em camundongos *knockout* para o gene APC, um modelo de polipose adenomatosa familiar, houve redução dramática do número e do tamanho dos pólipos, com a inibição da cox2, inferindo com isto sua participação nos primeiros passos da carcinogênese colônica. Em linhagens de linfomas de células B e de células B primárias, originárias de voluntários normais, foi demonstrada uma diminuição do cox2 nos dois grupos com o uso de inibidores de cox2 (Celecoxib^R). Esse efeito resultou no aumento da apoptose em 85% de todas as linhagens de células examinadas. Conseqüentemente, o resultado inferiu que o aumento da expressão e da atividade da cox2 contribui para a patogênese dos linfomas de células B (WUN et al. 2004).

1.3.4

Óxido nítrico e as suas sintases

O óxido nítrico (NO) é considerado um radical livre, pois apresenta um elétron não pareado em sua órbita externa. O NO é um importante mediador biológico de diversas funções em animais e

humanos, tendo a capacidade de reagir com outros radicais livres e metais pesados. O NO é produzido a partir de uma reação enzimática, na qual o substrato L-arginina é convertido em L-citrulina e NO. Essa reação é catalizada pelas sintases do óxido nítrico (SINGH e EVANS 1997).

As sintases do óxido nítrico (NOS, do inglês *Nitric Oxide Synthase*) são uma família de enzimas representadas por três isoformas diferentes. São classificadas respeitando-se a ordem histórica de purificação das enzimas, ou baseando-se no tipo celular no qual a enzima foi originalmente descrita, a saber:

NOS1, sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) ;

NOS2, sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) ;

NOS3, sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS).

As isoformas são codificadas por genes distintos. Em humanos as isoformas NOS1, NOS2 e NOS3 são codificadas nos cromossomos 12, 17 e 7, respectivamente (FORSTERMANN et al. 1995). As isoformas NOS1 e NOS3 são formas constitutivas, sendo dependente de cálcio e calmodulina para sua ativação e produzem pequenas quantidades de NO. A isoforma NOS2 foi originalmente descrita em macrófagos murinos ativados, podendo produzir altas concentrações de NO (nmoles). Sua síntese é induzida por vários fatores, dentre eles as citocinas e sua ação é independente de cálcio (FORSTERMANN et al. 1995 e 1998; SINGH e EVANS 1997).

O NO participa de vários mecanismos fisiológicos e patológicos. No câncer, o NO apresenta dualismo funcional, com ações pró e anti-tumorais. Os seus efeitos são modulados por interação direta e

indireta, e também são influenciados pela concentração e tipo específico de célula envolvida (KIM et al. 2001). Diversos mecanismos foram propostos para representar situações clínicas e experimentais distintas para explicar esse dualismo funcional. Como exemplo o trabalho de SHEN et al. (1998) em que na cultura de células endoteliais observou-se que baixas concentrações de NO podem contribuir para a sobrevivência das células e que, pelo contrário, as altas concentrações podem promover a destruição celular. MANNICK et al. (1994) observaram que o NO tem função na regulação da inibição da apoptose e manutenção da latência viral, quando verificaram que linfócitos B infectados pelos vírus de *Eipstein-Barr*, e também a linhagem celular de linfoma de *Burkitt* são capazes de produzir NO. Nesse experimento, a quantidade de NO produzida foi capaz de inibir a apoptose dos linfócitos. Em outro estudo de um modelo experimental de linfoma de células B murino observou-se nas análises imunoistoquímicas positividade somente para a NOS2, encontrada em macrófagos e nas células endoteliais do tumor. Também observou-se nos camundongos, que apresentavam o tumor, maior concentração de nitratos excretados na urina em comparação com os animais controles (TAMIR et al. 1995).

1.3.5 Correlação entre cox2 e NOS2

Há correlação entre as vias de ativação do NOS2 e cox2. Experimentos usando-se cicloxigenase (cox) purificada mostraram em condições fisiológicas a ligação do NO a um sítio específico do cox (TSAI et al. 1994). Esse mecanismo de interligação é complexo e ainda não está

totalmente esclarecido. Os *eicodanoids* podem reduzir a expressão de NOS2 e a produção de NO. O NO modula a formação de prostaglandina H₂ (SALVEMINI et al. 1993; TETSUKA et al. 1994, WEINBERG 2000). Essa interligação também foi observada em células epiteliais colônicas imortalizadas de camundongos (MEI et al. 2000). Esses autores estudaram três linhagens de células de câncer colônico (HCA7, HT29 e HCT116), tratadas com diferentes concentrações de S-nitrosogluconato, foi observado o efeito do NO nas células *in vitro* e sua relação com a expressão e atividade do cox2. Sendo encontrada uma correlação positiva entre NOS2 e cox2. Na literatura há ainda, trabalhos correlacionando NOS2 com a atividade da cox2 (FANTAPPIE et al. 2002). Esse trabalho avaliou cox2 e NOS2, através de métodos imunohistoquímicos (IQ), Northern e Western Blot, linhagens de células de hepatocarcinoma humano. Esses autores observaram que há inibição da produção de NO por inibidores de cox2, inferindo a interligação entre as vias cox2 e NOS2 (FANTAPPIE et al. 2002 e GALLO et al. 2003). Estudos recentes inferem que esta interação, cox2/NOS2/NO, pode envolver vias transcrição da *B* catenin/TCF-LEF em células de câncer coloriais (LIU et al. 2004). Outra possibilidade seria a inativação da p53 pelos produtos (PG) da cox2, resultando na inibição da apoptose (MOOS et al. 2000; RAO et al. 2004).

1.3.6

Considerações

Pela revisão da literatura até aqui apresentada, pouco se sabe a respeito da presença de NO em neoplasias linfóides malignas humanas. Embora a fisiologia da formação da resposta imune nos

linfonodos esteja bem conhecida, não há trabalhos relacionando a expressão das isoformas NOS, cox2 e p53 nas hiperplasias linfóides de padrão folicular e nos linfomas não-Hodgkin foliculares. Não há conhecimento de como é a expressão das NOS, bem como se ela ocorre nas hiperplasias linfóides. É bastante lógico que isso ocorra, uma vez que os Linfomas não-Hodgkin de células B as expressam. Fato observado no trabalho de MENDES et al. (2001), que todos os linfomas foliculares foram positivos para NOS1 e NOS2. Portanto, para entender a participação da NOS, cox2 e p53 nos processos de formação do Linfoma Folicular e Hiperplasia Folicular foi proposto o presente trabalho.

2**OBJETIVO**

Considerando que a apoptose é o evento celular mais importante na patogênese do Linfoma Folicular. O objetivo no presente trabalho é estudar a expressão IQ comparativa das isoformas de NOS, cox2 e proteína p53 nas Hiperplasias Linfóides de padrão folicular e nos Linfomas Foliculares.

3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1

CASUÍSTICA

A partir das informações no arquivo do departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo-Fundação Antônio Prudente, foram selecionados 90 casos de linfomas não-Hodgkin foliculares (LF) e 137 de hiperplasias linfóides de padrão folicular (HF). Desses últimos, 92 casos eram de tonsilas faríngeas. O período abrangido foi de 1980 a 2001. Após o resgate de todas as lâminas e blocos de parafina dos casos, novas lâminas de hematoxilina e eosina (H.E.) foram confeccionadas. Os casos de linfoma folicular foram reclassificados segundo a OMS (JAFFE et al. 2001). Os critérios de inclusão para os LF foram os seguintes: caso fosse de grau arquitetural I (ou seja, mais do que 75% de área nodular) e de baixo grau citológico (ou seja, com menos de cinco centroblastos por campo de maior aumento). Esse critério de seleção está ilustrado na Figura 1. Para os casos de hiperplasia folicular foram considerados os casos com evidente formação de centros germinativos, mas com preservação da arquitetura linfonodal e tonsilar, conforme ilustrado nas Figuras 2 A / 2 B. Todos os casos foram submetidos a reação imunoistoquímica, visando a detecção da proteína bcl2 para a confirmação diagnóstica. A expressão da oncoproteína bcl2 foi positiva em 100% dos LF e negativa nos centros germinativos em 100% dos casos de hiperplasia folicular.

2

CONFEÇÃO DO TISSUE MACROARRAY

(TMA)

Após a preparação das lâminas pela coloração de hematoxilina e eosina (H.E.) dos blocos selecionados, estas foram analisadas e duas áreas foram delimitadas com caneta apropriada para marcação. As áreas marcadas consistiam em formações nodulares nos linfomas foliculares e em centros germinativos hiperplásicos das hiperplasias foliculares. Posteriormente, foram delimitadas as áreas nos blocos de parafina, chamados de blocos doadores. Dos blocos doadores foram retirados fragmentos cilíndricos de 1mm e estes acondicionados em um outro bloco chamado de bloco receptor. Cada bloco doador foi representado em duplicata no bloco receptor. Esta etapa foi realizada em um aparelho preciso (*Tissue Arrayer*) da marca Beecher Instruments^R (Silver Spring MD). Foram confeccionados dois blocos de *arrays*, um com os 90 casos de LF e outro com os 137 de HF, conforme demonstrado nas figuras 3A / B. Os casos foram dispostos em ordem numérica crescente de acordo com o registro anátomo-patológico e amostrados em duplicata.

Em seguida esses blocos foram levados ao micrótomo de parafina e obtidos cortes histológicos sequenciais de 3 μ que foram dispostos em lâminas com adesivos da marca Microsystems Inc^R. (RIMM et al. 2001; HEDVAT et al. 2002; HSU et al. 2002). As lâminas de TMA foram desparafinadas, desidratadas e cortes histológicos a cada 9 níveis diferentes foram corados pelo H.E. Posteriormente foram selecionadas duas lâminas de cada bloco para cada anticorpo para serem submetidas à reação

imunoistoquímica.

3.3 IMUNOISTOQUÍMICA

Uma vez selecionados os casos pelos critérios morfológicos descritos e construído o bloco de tissue array (vide secção 3.2), o painel imunoistoquímico (IQ) foi completado, realizando-se reações para os anticorpos que reconhecem as isoformas do óxido nítrico (NOS 1, NOS2, NOS3), além dos anticorpos para proteínas p53 e ciclooxigenase2. O Quadro 1 abaixo apresenta a lista completa dos anticorpos com respectivos clones, origem de fabricação e diluição usada. As reações imunoistoquímicas foram realizadas pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO). Foram realizados um controle positivo e um negativo para cada reação.

Anticorpo	Clone	Origem	Diluição final de trabalho
NOS1	16	Transduction ^R	1:200
NOS2	6	Transduction ^R	1:40
NOS3	3	Transduction ^R	1:200
bcl-2	124	Dako ^R	1:40
p53	D07	DaKo ^R	1:100
cox2	4HR	Novocastra ^R	1:6000

Quadro 1 - Listagem dos anticorpos a serem utilizados no projeto em relação ao antígeno, clones, origem e diluição.

Os passos técnicos realizados foram os já tradicionalmente descritos na literatura e vistos em livros texto (SANTOS et al. 1999). Resumidamente

o protocolo pode ser visto no Anexo 1 desta dissertação.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e avaliada de acordo com a localização da marcação (citoplasma e ou núcleo), intensidade e frequência, para os anticorpos das três isoformas NOS e cox2, modificado a partir do trabalho de SOINI et al. (2000). Calculado um escore a partir da multiplicação dos valores intensidade da coloração com o número de células positivas. A intensidade foi dividida em 3 graus com a seguinte graduação demonstrada no Quadro 2.

Descrição da intensidade	Grau
Coloração negativa	0
Coloração de intensidade fraca	1
Coloração de intensidade moderada	2
Coloração de intensidade forte	3

Quadro 2 - Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com a intensidade.

Enquanto a frequência foi dividida em 4 graus com a seguinte graduação demonstrada no Quadro 3.

Descrição do número de células coradas	Grau
Menor que 5 %	0
Entre 5% e 10 %	1
Entre 11% e 50 %	2
Entre 51% e 90%	3
Maior de 90 %	4

Quadro 3 - Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com o número de células coradas.

Após o cálculo do escore final nas quatro observações, foram calculadas as médias entre eles. Finalmente, os resultados foram categorizados como demonstrado no Quadro 4.

Média do valor multiplicados nas 4 observações	Interpretação
0 a 5	Negativo
maior que 5,0	Positivo

Quadro 4 - Interpretação da média calculada nas quatro observações.

Já o anticorpo p53 foi considerado positivo; quando o número de células positivas com marcação nuclear foi maior que 10% em pelo menos uma das quatro observações. E na HF o anticorpo p53 foi avaliado nos centros germinativos ativados, tendo o mesmo critério de positividade do LF.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi utilizada para demonstrar a frequência da expressão dos marcadores nos grupos LF e HF. Para tanto, os dados dos diversos marcadores foram colocados em tabela. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa de computador SPSS for Windows v.10. Empregou-se o teste de qui-quadrado de *Pearson* ou teste exato de *Fisher*, a fim de verificar a associação entre os grupos (LF e HF) e as diversas variáveis imunoistoquímicas. Esses testes também foram utilizados para avaliar a associação entre as variáveis imunoistoquímicas. O nível de

significância considerado foi de 5%.

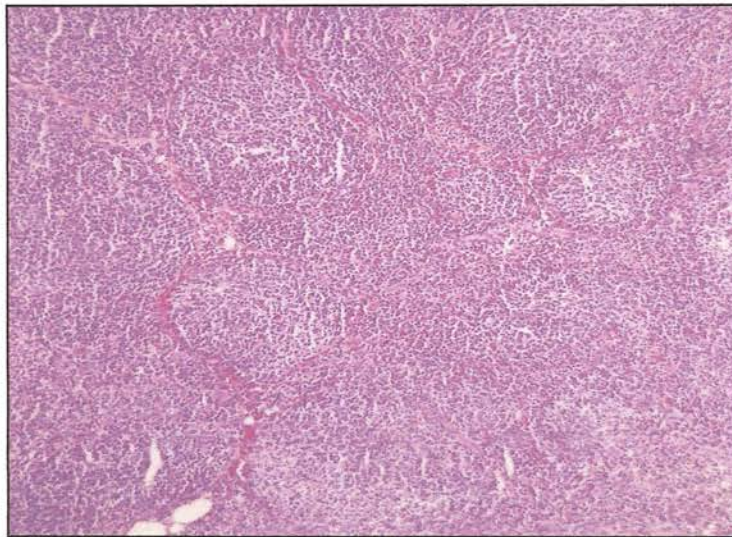


Figura 1 - Demonstrando arranjo arquitetural folicular > 75% no LNHF (H&E, aumento original de 200x).

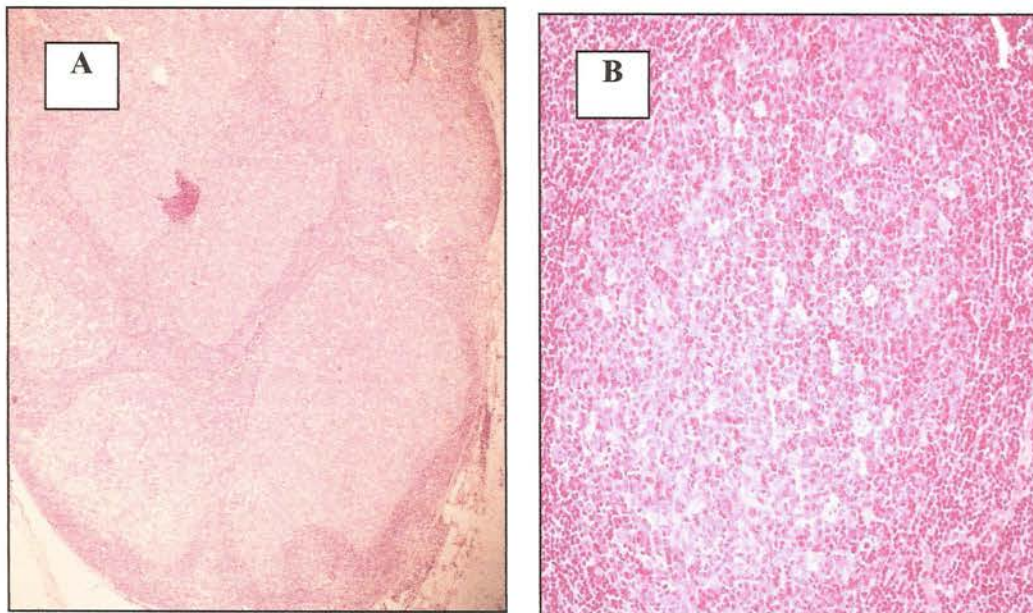


Figura 2: A - Tonsila faríngea demonstrando arranjo arquitetural folicular (H&E, aumento original de 200x).

Figura 2: B - Demonstrando centro germinativo hiperplásico da tonsila faríngea (H&E, aumento original de 400X).

A-



B-



Figura 3 A - Demonstrando foto da lâmina corada pela H.E. do bloco de array de Linfoma Folicular (H&E).

Figura 3 B - Demonstrando foto da lâmina corada pela H.E. do bloco de array de Hiperplasia Folicular (H&E)

4 RESULTADOS

A frequência de expressão dos marcadores imunoistoquímicos (IQ), referidos no Quadro 1, nos grupos (LF e HL), e a análise da associação entre os grupos (LF e HF) e os diversos marcadores IQ estão descritos abaixo e sumarizados na Tabela 1. Os casos não avaliáveis foram em decorrência de problemas técnicos durante a construção do array.

A análise da associação entre dois marcadores IQ distintos no grupo dos LF ou no grupo das HF estão também descritos abaixo e sumarizados nas Tabelas 2 a 7.

4.1 RESULTADOS DAS FREQUÊNCIAS DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NOS LINFOMAS FOLICULARES

Para o antígeno NOS1 com marcação citoplasmática em um número total de 88 casos avaliados, foram observados 66 casos (75,0%) com marcação positiva e 22 casos (25,0%) considerados negativos. Para o antígeno NOS1, a marcação foi nuclear e foram observados 64 casos (72,7%) com marcação positiva e 24 casos (27,3%) considerados negativos, em um número total de casos avaliáveis de 88 (n=88).

Para o antígeno NOS2 a marcação foi citoplasmática de padrão granular. Observou-se 16 casos (17,8%) positivos e 74 casos (63,0%)

considerados negativos, em um total de casos avaliáveis de 90 (n=90).

Para o antígeno NOS3 a marcação observada foi citoplasmática, sendo que 70 casos (78,7%) apresentaram marcação positiva, como demonstrados na figura 4B. Dezenove 19 casos (21,3%) foram considerados negativos, em um número total de casos avaliáveis de 89 (n=89).

Para o antígeno cox2 a marcação observada foi citoplasmática de padrão granular, sendo que 5 casos (5,6%) apresentaram marcação positiva e 85 casos (94,4%) foram considerados negativos, em um número total de casos avaliáveis de 90 (n=90).

Para o antígeno p53 foram observados 58 casos (64,4%) positivos e 32 casos (35,6%) foram considerados negativos. Esses dados foram sumarizados na Tabela 1.

4.2 RESULTADOS DAS FREQUÊNCIAS DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NAS HIPERPLASIAS LINFÓIDES DE PADRÃO FOLICULAR

Para o antígeno NOS1 com marcação citoplasmática, em um número total de 137 casos avaliados, foram observados 119 casos (86,9%) com marcação positiva e 18 casos (13,1%) foram considerados negativos. E para o antígeno NOS1 com marcação nuclear, em um número total de 137 casos avaliados, foram observados 129 casos (94,2%) com marcação positiva e 8 casos (5,8%) foram considerados negativos.

Para o antígeno NOS2 a marcação foi citoplasmática de padrão granular, em um número total de 135 (n=135) casos avaliáveis, como foi

ilustrado na Figura 5. Observou-se 120 casos (88,9%) positivos e 15 casos (11,1%) considerados negativos.

Para o antígeno NOS3 a marcação observada foi citoplasmática, sendo que 123 casos (91,1%) apresentaram marcação positiva, como demonstrado na Figura 4A. Doze casos (8,9%) foram considerados negativos. Em um número total de casos avaliáveis de 137 (n=137).

Para o antígeno cox2 a marcação observada foi citoplasmática de padrão granular, sendo que 17 casos (12,4%) apresentaram marcação positiva e 120 casos (87,6%) foram considerados negativos, em um total de casos avaliáveis de 137 (n=137).

Para o antígeno p53 foram observados apenas para 9 casos (6,7%) positivos e 126 casos (93,3%) foram considerados negativos. Esses dados foram sumarizados na Tabela 1.

4.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GRUPOS LINFOMAS FOLICULARES E HIPERPLASIAS LINFÓIDES DE PADRÃO FOLICULAR SEGUNDO CADA ANTÍGENO

Notou-se associação entre os grupos (LF e HF) para os seguintes antígenos, NOS1 c ($p=0.023$), NOS1 n ($p<0.0001$), NOS2 ($p<0.0001$), NOS3 ($p=0.008$), p53 ($p<0.0001$), utilizando o teste qui-quadrado de *Pearson*. No entanto, não observou se associação entre os grupos (LF e HF) para o antígeno cox2 ($p=0.088$), utilizando o teste qui-quadrado de *Pearson*. Esses dados foram sumarizados na Tabela 1.

4.4 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE DOIS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS DISTINTOS NO GRUPO DOS LINFOMAS NÃO-HODGKIN FOLICULARES

Não houve associação entre os seguintes antígenos: NOS2 e cox2 ($p=1.0$); p53 e cox2 ($p=0.343$); p53 e NOS2 ($p=0.780$), no grupo dos LF. Foi utilizado o teste exato de *Fisher* nas duas primeiras análises e o teste qui-quadrado de *Pearson* na última. Esses dados estão descritos nas Tabelas 2, 3 e 4.

4.5 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE DOIS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS DISTINTOS NO GRUPO DAS HIPERPLASIAS LINFÓIDES DE PADRÃO FOLICULAR

Notou-se associação entre os antígenos p53 e cox2 ($p=0.015$) no grupo das HF. E não houve associação entre os seguintes antígenos: NOS2 e cox2 ($p=0.215$); p53 e NOS2 ($p=0.597$) no grupo das HF. Nessas análises foi utilizado o teste exato de *Fisher*. Esses dados estão descritos nas Tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 1 - Resultado geral dos antígenos (NOS1 c, NOS1 n, NOS2, NOS3, cox2, p53) dos 90 casos de linfomas foliculares, 137 casos de hiperplasias linfóides de

padrão folicular, as análises da associação entre os grupos (LF e HF) e os diversos marcadores imunoistoquímicos.

Marcador	Categoria	LF		HF	
		n	%	n	%
NOS1 c * 88/137	negativo	22	25,0%	18	13,1%
	positivo	66	75,0%	119	86,9%
NOS1 n ** 88/137	negativo	24	27,3%	8	5,8%
	positivo	64	72,7%	129	94,2%
NOS2 ** 90/135	negativo	74	82,2%	15	11,1%
	positivo	16	17,8%	120	88,9%
NOS3 *** 89/137	negativo	19	21,3%	12	8,9%
	positivo	70	78,7%	123	91,1%
cox2 **** 90/137	negativo	35	94,4%	120	87,6%
	positivo	5	5,6%	17	12,4%
p53 ** 90/135	negativo	32	35,6%	126	93,3%
	positivo	58	64,4%	9	6,7%

Foi utilizado o teste qui-quadrado de *Pearson* (nível descritivo do teste foi $p < 0.05$). Os resultados obtidos utilizando o teste qui-quadrado foram * $p = 0.023$, ** $p < 0.0001$, *** $p = 0.008$, **** $p = 0.088$.

Abrev. LF – linfoma não-Hodgkin folicular, HF – hiperplasia folicular, NOS - sintases do óxido nítrico, cox2 - ciclooxigenase2.

Tabela 2 - Resultados das análises da associação entre NOS2 e cox2 no grupo dos Linfomas Foliculares.

Marcadores			cox2			
NOS2	Categorias		Negativo	n (%)	Positivo	n (%)
	Negativo	n (%)	70 (94,6%)		4 (5,4%)	
		Positivo	n (%)	15 (93,8%)		1 (6,3%)
$p= 1,0$						

Utilizado teste exato de *Fisher* (nível descritivo do teste foi $p=0.05$).

Tabela 3 - Resultados das análises da associação entre p53 e NOS2 no grupo dos Linfomas Foliculares.

Marcadores			NOS2			
p53	Categorias		Negativo		Positivo	
				n (%)		n (%)
p= 0.692	Negativo	n (%)	27	(84,2%)	5	(15,6%)
	Positivo	n (%)	47	(81,0%)	11	(19%)

Utilizado teste exato de qui-quadrado de *Pearson* (nível descritivo do teste foi $p=0.05$).

Tabela 4 - Resultados das análises da associação entre p53 e cox2 no grupo dos Linfomas Foliculares.

Marcadores			cox2			
p53	Categorias		Negativo	n (%)	Positivo	n (%)
	Negativo	n (%)				
p= 0.343	Negativo	n (%)	29	(90,6%)	3	(9,4%)
	Positivo	n (%)	56	(96,6%)	2	(3,4%)

Utilizado teste exato de *Fisher* (nível descritivo do teste foi $p=0.05$).

Tabela 5 - Resultados das análises da associação entre NOS2 e cox2 no grupo das Hiperplasias Linfóides de padrão folicular.

Marcadores		cox2				
NOS2	Categorias		Negativo	n (%)	Positivo	n (%)
	Negativo	n (%)				
p= 0.215	Negativo	n (%)	15 (100%)		0	
	Positivo	n (%)	103 (85,8%)		17 (14,2%)	

Utilizado teste exato de *Fisher* (nível descritivo do teste foi $p=0.05$).

Tabela 6 - Resultados das análises da associação entre p53 e cox2 no grupo das Hiperplasias Linfóides de padrão folicular.

Marcadores			cox2	
p53	Categorias		Negativo	Positivo
		n (%)	n (%)	n (%)
	Negativo	n (%)	113 (89,7%)	13 (10,3%)
p= 0.015	Positivo	n (%)	5 (55,6%)	4 (44,4%)

Utilizado teste exato de *Fisher* (nível descritivo do teste foi $p= 0.05$).

Tabela 7 - Resultados das análises da associação entre p53 e NOS2 no grupo das Hiperplasias Linfóides de padrão folicular.

Marcadores			NOS2	
p53	Categorias		Negativo	Positivo
		n (%)	n (%)	n (%)
	Negativo	n (%)	15 (12,0%)	110 (88%)
p= 0.597	Positivo	n (%)	0	9 (100%)

Utilizado teste exato de *Fisher* (nível descritivo do teste foi $p= 0.05$).

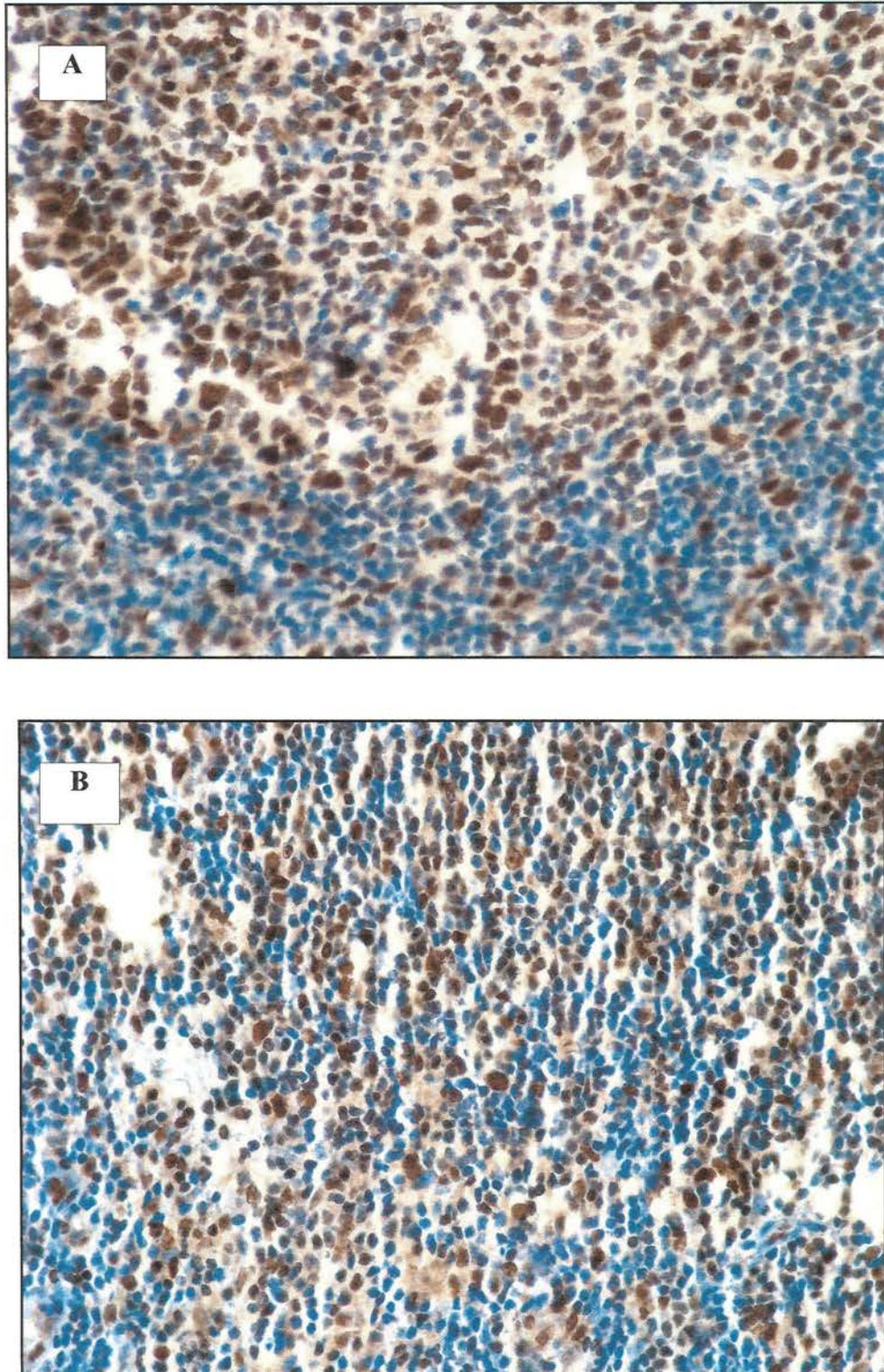


Figura 4 - Demonstrando marcação IQ nuclear e citoplasmática da NOS1.(aumento original de 400x) **A** - Hiperplasia Folicular. **B** - Linfoma Folicular.

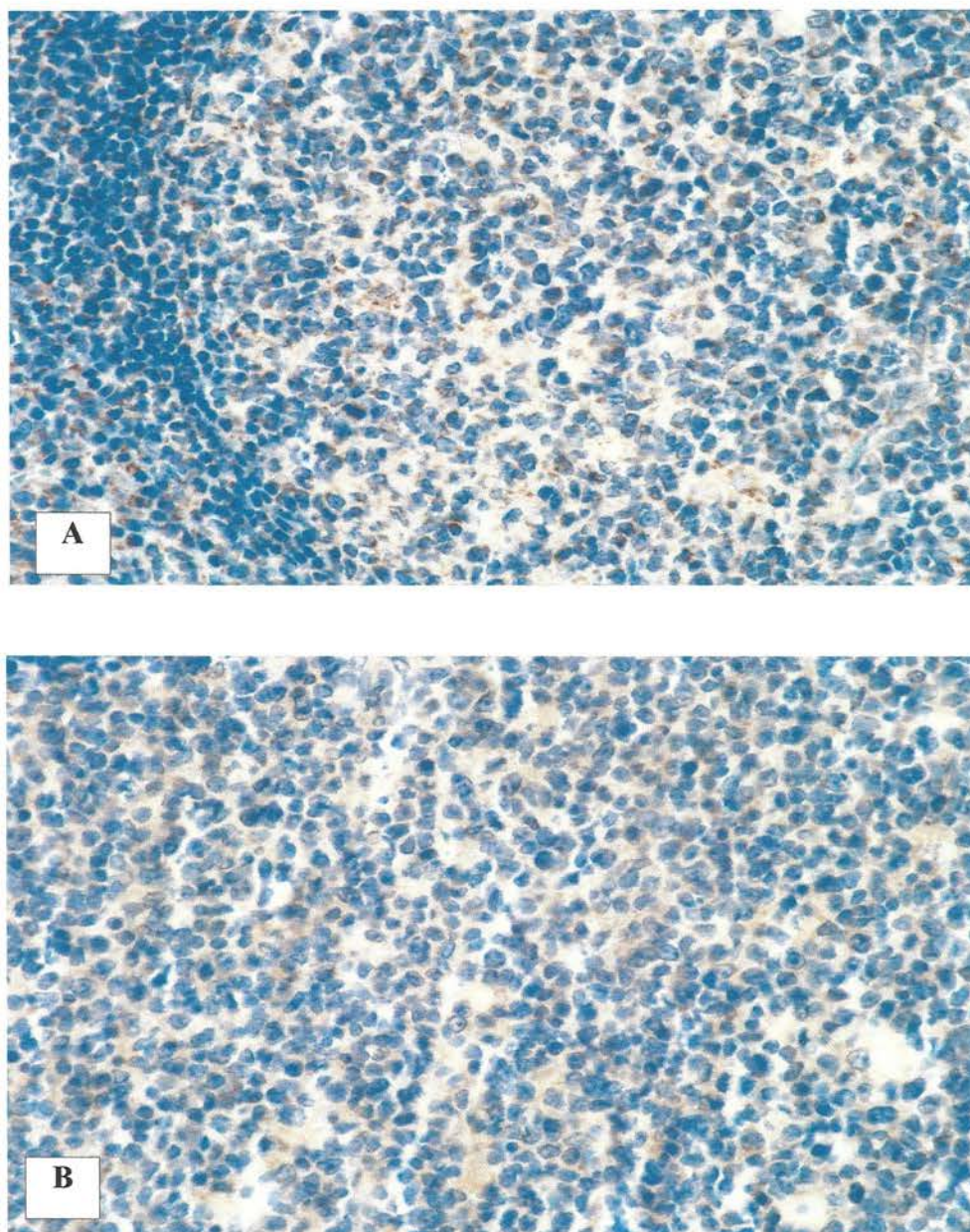


Figura 5 - Demonstrando o padrão de marcação IQ citoplasmática granular da NOS2 (aumento original de 200X). **A** - Hiperplasia Folicular. **B** - Linfoma

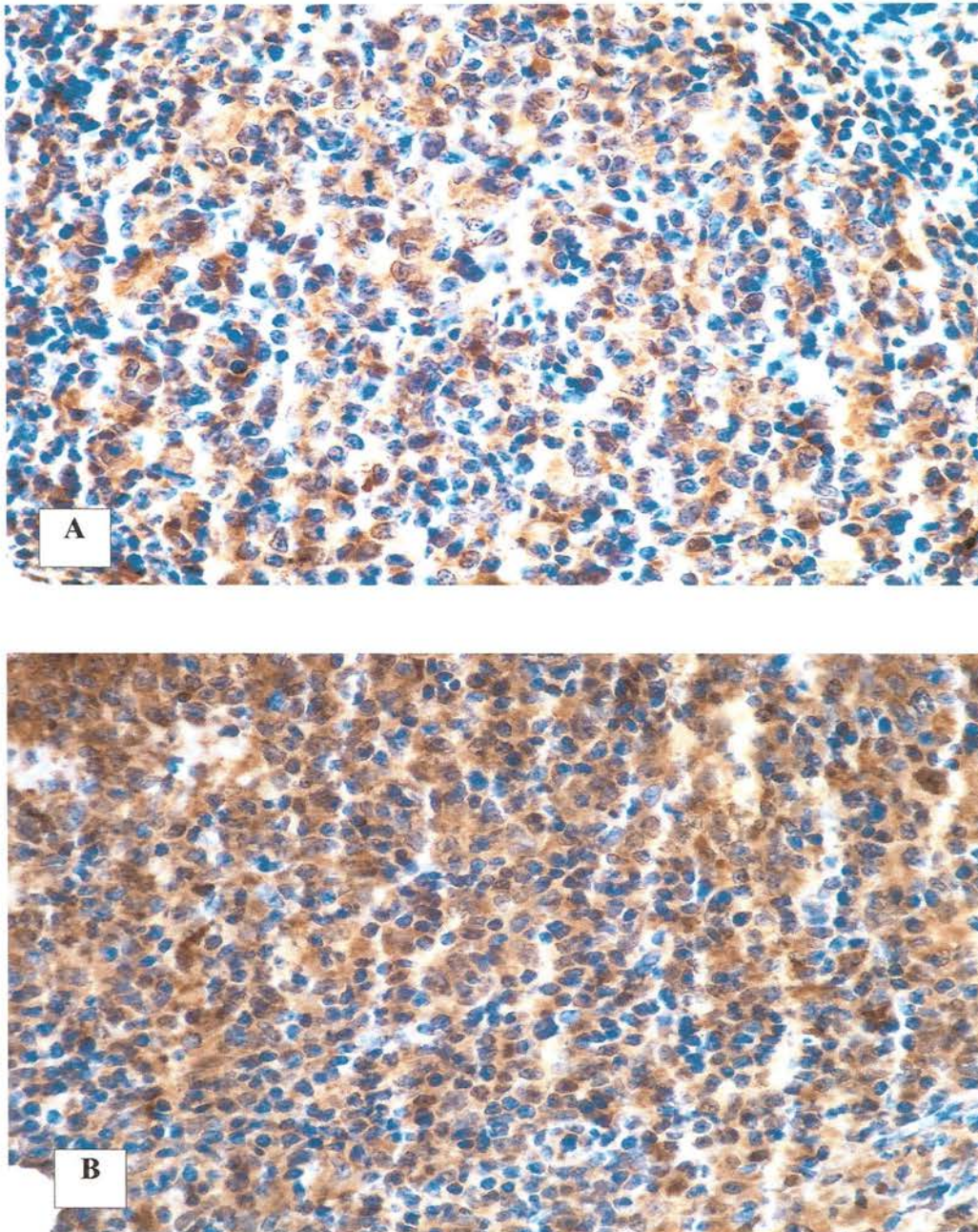


Figura 6 - Demonstrando o padrão de marcação IQ nuclear e citoplasmática da NOS3 (aumento original de 400X). **A** - Hiperplasia Folicular. **B** - Linfoma Folicular.

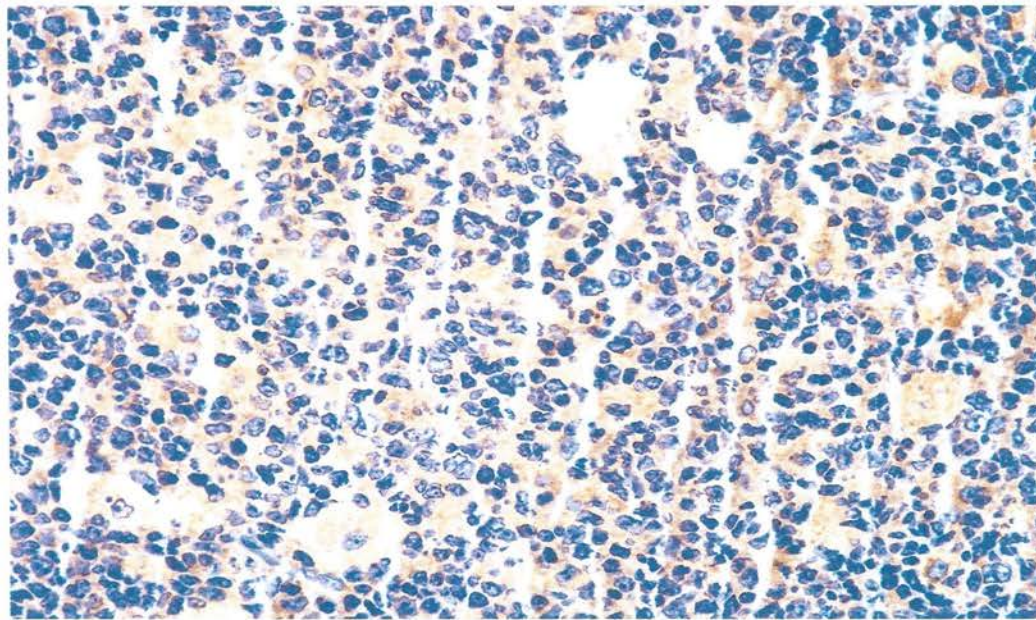
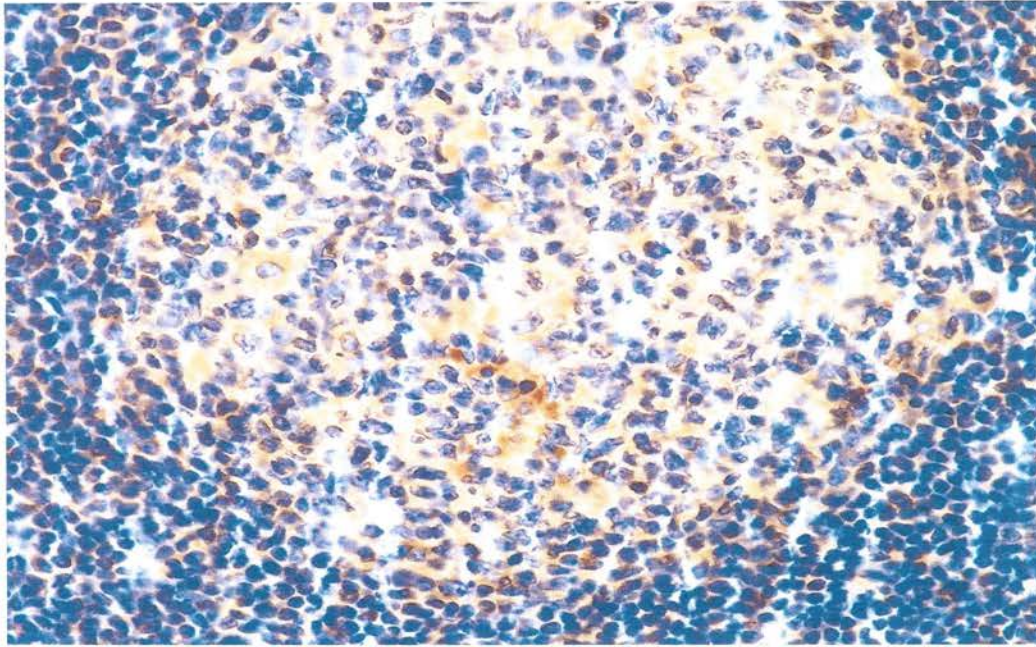


Figura 7 - Demonstrando o padrão de marcação IQ citoplasmática da *cox2* (aumento original de 200X). **A** - Hiperplasia Folicular. **B** - Linfoma Folicular.

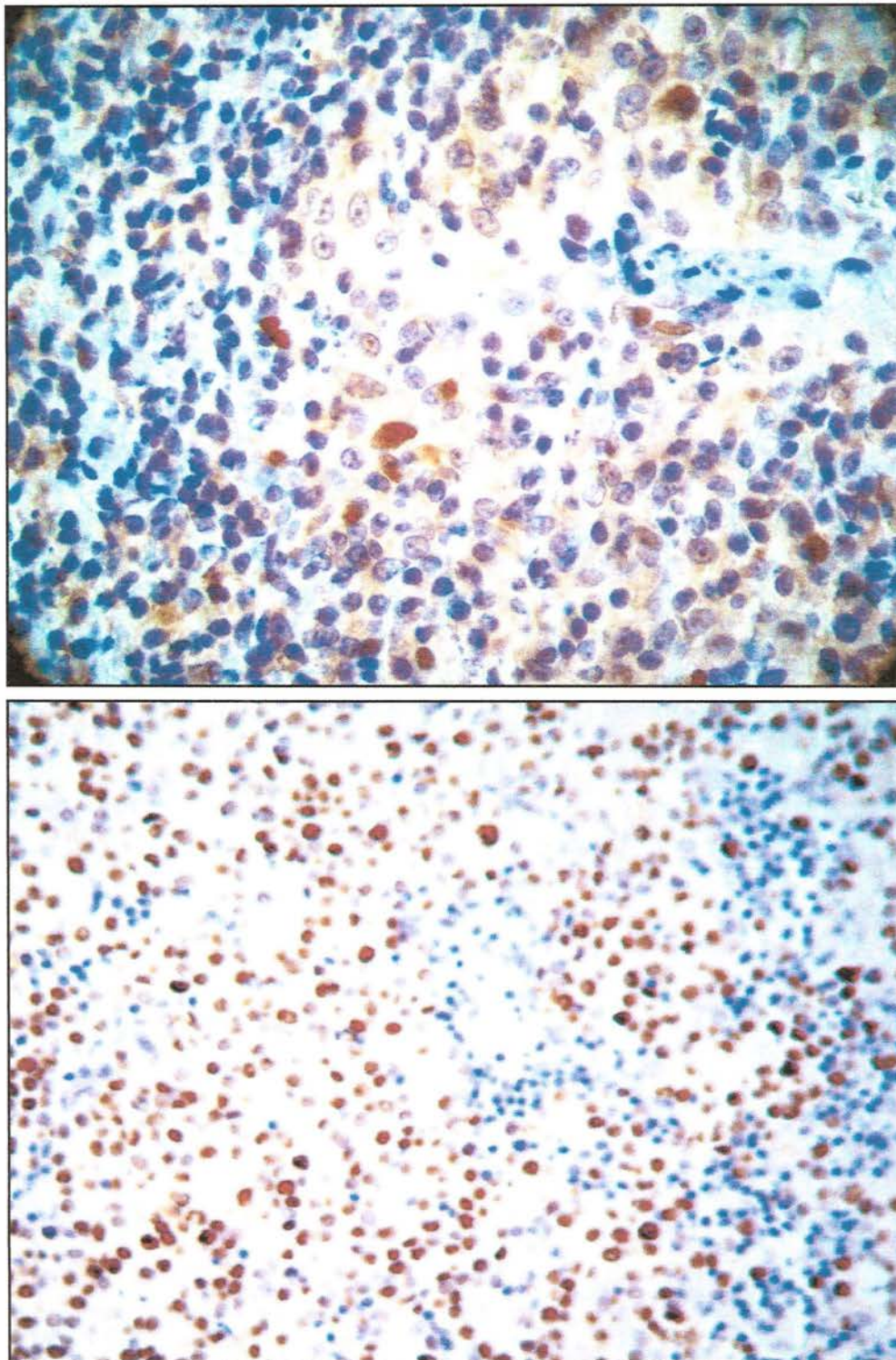


Figura 8 - Demonstrando o padrão de marcação IQ nuclear da p53 (aumento original de 200X). **A** - Hiperplasia Folicular. **B** - Linfoma Folicular.

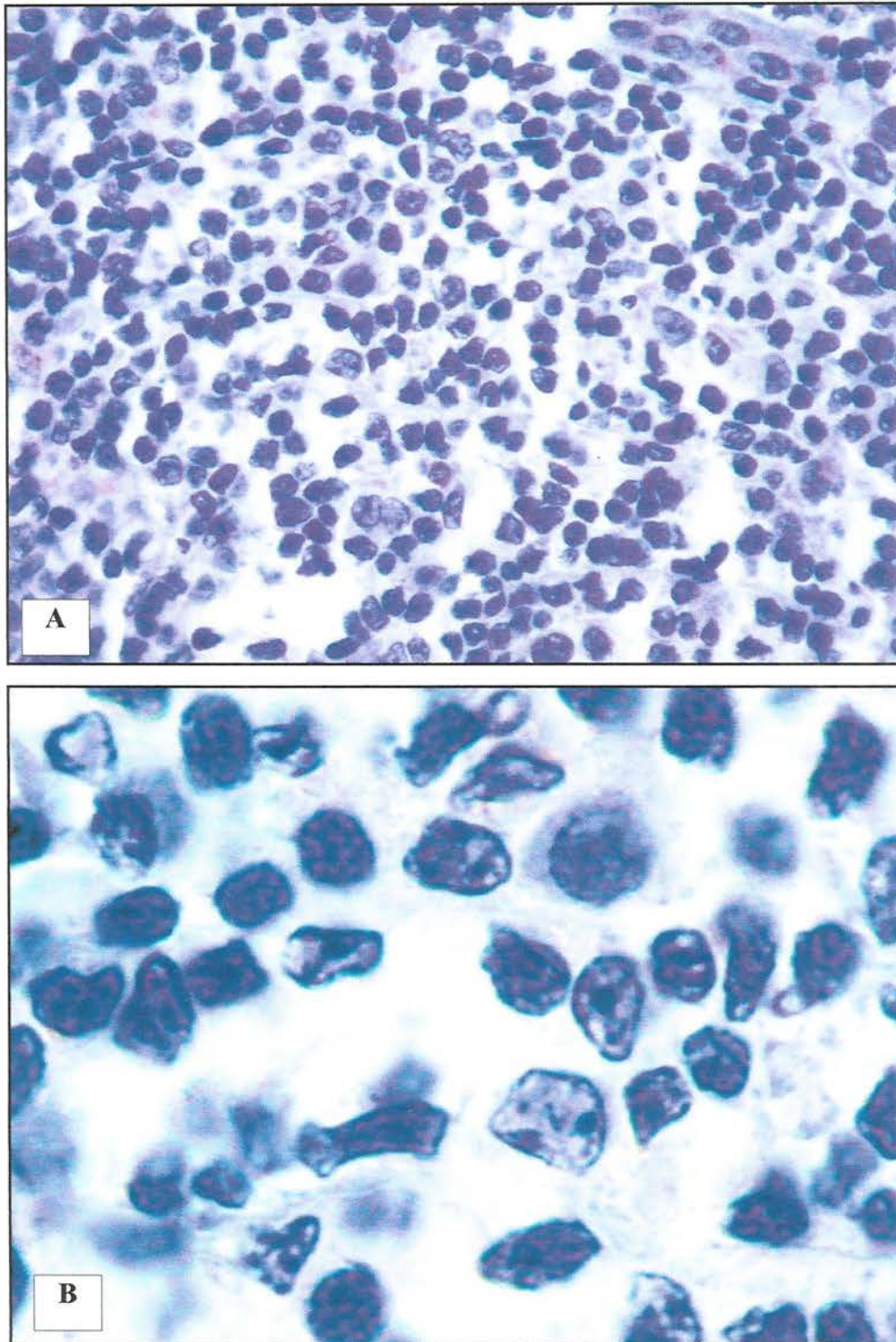


Figura 9 - Demonstrando a negatividade da marcação IQ para NOS2 **A** - Hiperplasia Folicular (aumento original de 400X). **B** - Linfoma Folicular (aumento original de 1000X).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão das isoformas das sintases do óxido nítrico, cox2 e proteína p53 nos Linfomas Foliculares e nas Hiperplasias Linfóides de padrão folicular. Essa análise não havia sido realizada anteriormente, de forma sistemática pela literatura. Um dos principais achados do estudo foi a expressão freqüente para os antígenos NOS 1, 2 e 3 nos centroblastos e centrócitos dos Linfomas Folicular, aspecto esse que corrobora o observado no trabalho de MENDES et al. (2001). Nesse trabalho um número pequeno de casos de Linfomas não-Hodgkin de células B foi avaliado (n=16), sendo que a grande maioria foi positiva. Dentre esta casuística, 100% (n=5) dos linfomas foliculares foram positivos para NOS1 e NOS2 e nenhum para NOS3. Esse é o único trabalho na literatura que avaliou a expressão das isoformas de NOS em centroblastos e centrócitos. As isoformas de NOS têm sido detectadas em tumores de mama (MACIEL 2002), carcinomas gástricos (BEGNAMI 2003), carcinomas de cabeça e pescoço (FISCHER 2003), Linfomas de Hodgkin (CAMPOS 2005).

Os resultados atuais mostram que quando analisada uma casuística maior, observa-se resultado diferente, especialmente em relação as isoformas NOS2 e NOS3. Essa discrepância pode ser justificada simplesmente pela diferença de amostragem. Cumpre ainda realçar que os cinco casos estudados por MENDES et al. (2001) eram todos de grau histológico 1 (menos do que cinco centroblastos por campo de grande aumento) e a presente casuística abrangeu um espectro mais largo de

diferenciação citológica (informação pessoal).

Outros trabalhos avaliaram a expressão das isoformas de NOS em outras células B, em modelos experimentais (TAMIR et al. 1995). Esses autores estudaram a expressão das isoformas de NOS em um modelo de linfoma de células B murino, e as análises imunoistoquímicas revelaram positividade somente para NOS2, demonstrada apenas em macrófagos e nas células endoteliais do tumor, e não nas células do linfoma. Também foi observado que os camundongos com tumor tinham maiores concentrações de nitratos excretados na urina em comparação com os animais controles, demonstrando o aumento da produção de NO decorrente da ação de NOS2, mas provavelmente secundário a células inflamatórias não-tumorais.

Quando se comparou a HF com o LF, a HF mostrou a expressão de NOS1 c, NOS1 n, NOS2, NOS3 significativamente mais freqüente do que no LF. Em relação ao cox2 houve uma tendência à significância ($p=0.08$), também em favor da HF. O significado biológico desse achado é difícil de se avaliar. Uma das hipóteses possíveis é que a expressão dessas moléculas esteja relacionada com a apoptose. O mecanismo de apoptose é importante na patogenia dessas duas entidades. Todas as células B do centro germinativo que não se diferenciam em células B de memória, são eliminadas por apoptose (SOARES et al. 2000). Portanto, nas HF esse mecanismo está bastante ativado (VAN EIJK et al. 2001). Por outro lado, os LF tem através da inibição da apoptose via superexpressão da oncoproteína bcl2 o seu principal mecanismo de progressão (HOLLOWOOD e MACARTNEY 1991; VOUTSADAKIS 2000). Uma hipótese atraente é que essas moléculas participem na patogênese da apoptose induzida,

demonstrada pelo predomínio da expressão das isoformas de NOS nas hiperplasias. Como a expressão das enzimas é uma forma indireta de se demonstrar a produção de NO, uma possibilidade para o melhor entendimento e análise desta hipótese seria mensurar a quantidade de óxido nítrico produzido pelas células em cada uma destas situações.

Conforme citado, nas HF sabemos que o mecanismo de apoptose encontra-se ativado (LEBECQUE et al. 1997; VAN EIJK et al. 2001). E no presente trabalho observou-se a expressão de NOS2 nas HF em 88,9% dos casos, contra 17,8% nos LF. O aumento da NOS2 está relacionado ao aumento da produção do NO (TAMIR et al. 1995; LALA e CHAKRABORTY 2001) e por consequência pode explicar a ativação da apoptose nos centros germinativos hiperplásicos das HF. A participação do NO na apoptose pode ser dualística dependendo da sua concentração (BLAISE et al. 2005). LI et al. (2004) relatam que NO induz a liberação de SMAC pela mitocôndria em linhagens de células linfoplasmocitóide deflagrando a apoptose. Também, o NO tem a função de aumentar a concentração de ceramida, pela diminuição da atividade da ceramidase. O aumento da concentração de ceramida causa um efeito pró-apoptótico, através da diminuição da expressão da bcl2 (DI NARDO et al. 2000). Ao contrário, há relatos na literatura, os quais observou-se que nas linhagens de linfócitos B (N958 infectados por EBV e BJAB não infectados por EBV) a expressão aumentada de NOS2 com a inibição da apoptose e manutenção da latência viral (MANNICK et al. 1994). DODD et al. (2000) utilizando cultura de células de linfoma Nb2 prolactina dependente demonstrou que o NO produzido pelo NOS3 pode inibir a apoptose. A função do óxido nítrico na apoptose é controverso, sua ação

anti-apoptótica e pró-apoptótica é discutida amplamente na literatura. A grande maioria dos autores concluem que a ação do NO está na dependência do tipo celular envolvido, da concentração do NO e tempo de exposição (SHEN et al. 1998; KIM et al. 2001; BLAISE et al. 2005).

Não há trabalhos na literatura que demonstrem pelo método imunoistoquímico a positividade das isoformas de NOS em HF. A positividade para NOS1, NOS2 e NOS3 nos centros germinativos hiperplásicos das HF constatadas neste trabalho é inédita.

No presente trabalho observamos positividade para a p53 em 64,4% dos casos de LF, enquanto que apenas 6,7% da HF são positivas. Esse resultado corrobora com dados da literatura, pois o *Tp53* é um supressor de tumor que encontra-se mutado em mais de 50% de todas as neoplasias humanas (DONEHOWER et al. 1992), incluindo os linfomas (SAID et al. 1992). Ele codifica a proteína p53 que tem um papel na parada do ciclo celular e indução da apoptose em resposta aos danos provocados no DNA (DONEHOWER et al. 1992; CHANG et al. 1993). Estudos anteriores demonstraram que a p53 é positiva nos LF e que sua expressão aumenta com o aumento do grau histológico (COOPER e HAFFAJEE 1997).

A positividade para a bcl2 foi observada em 100% dos casos LF. COOPER e HAFFAJEE (1997), encontraram 97% de casos positivos para bcl2 em LF e VIARDOT et al. (2003) observaram de 80 a 90% de translocações cromossômicas que resultaram em superexpressão de bcl2. Os casos de LF foram revistos e os casos com dúvida diagnóstica ou com predomínio de centroblastos foram excluídos. FALINI e MASON (2002) referem que a expressão do bcl2 pode ser heterogênea, pois os

centroblastos tendem a ser negativos e os centrócitos positivos. Esses dois fatos explicam o achado de 100% dos LF positivos para bcl2, desta dissertação.

Há correlação positiva da expressão da bcl2 e p53 nos LF (COOPER e HAFFAJEE 1997), entretanto em outros linfomas não-Hodgkin (NAKAMURA et al. 1996), bem como no carcinoma de cólon (CARR et al. 2002) esta correlação é inversa. No presente trabalho há também correlação positiva entre a frequência de expressão de bcl2 e p53. Em cultura de células a expressão do bcl2 inibe a apoptose via p53 dependente (CHIOU et al. 1994). Portanto este dado sugere a participação da p53 na patogênese dos LF.

O presente estudo não demonstrou associação entre os antígenos NOS2 e cox2 nos grupos dos LF ($p= 1.0$) e das HF ($p= 0.215$). Estes achados não encontram apoio em dados da literatura (GALLO et al. 2002; MARROGI et al. 2000; FANTAPPIE et al. 2002). O estudo da expressão de NOS2 e cox2 em linhagens de células de carcinoma hepatocelular humano, por imunoistoquímica, Northern e Western Blot demonstraram resultados sugerindo que a expressão de cox2 pode modular, *in vitro*, a liberação de NO em linhagens de células de carcinoma hepatocelular (FANTAPPIE et al. 2002). Vários outros trabalhos na literatura investigam a interação entre os mecanismos de produção do NOS2 e cox2. MEI et al. (2000) estudaram a expressão de NOS2 e cox2, além da produção de prostaglandinas E2 e NO, contudo obtiveram resultados que inferi a influência e interferência de NOS2 na produção de cox2. Os achados de VON KNETHEN e BRUNE (1997), somados aos novos trabalhos que posteriormente foram publicados (RAO et

al. 2004), sustentam a hipótese de que há correlação entre NO/NOS2 e a atividade da cox2. Os achados desta dissertação contrariam os dados da literatura. Contudo, o mecanismo que interliga as duas vias ainda não está totalmente esclarecido na literatura.

É notório que o NO produzido em altas concentrações pela NOS2 e sua ação de forma persistente em muitos tipos celulares, danifica para o DNA. O dano no DNA resulta no aumento da expressão da proteína p53 e uma ativação dos mecanismos reparadores. Por consequência, se não reparada a célula entra em apoptose. AMBS et al. (1999) demonstraram a relação entre a mutação do *Tp53* com o aumento da atividade da NOS2 em câncer colorretal. Em concordância com esse último autor, GALLO et al. (2003) também encontraram correlação positiva entre o acúmulo da p53 e a atividade da NOS2, em 43 casos de câncer de cabeça e pescoço. Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que não há associação entre os antígenos NOS2 e p53 nos grupos dos LF ($p= 0.780$) e das HF ($p= 0.597$), em contraste ao observado por outros autores. Estudos anteriores relataram uma correlação positiva entre a NO/NOS2 e a proteína p53 (FORRESTER et al. 1996; BRENNAN et al. 2000). BRENNAN et al. (2000) estudaram 56 casos de carcinoma de células escamosas da língua, utilizando anticorpos monoclonais para p53 e NOS2 e observaram correlação positiva ($p<0.001$). Os autores inferem que o gene p53 mutado pode ser responsável por um *feedback* negativo e como consequência um aumento da expressão de NOS2. Outra possibilidade seria o aumento da p53 não mutada em resposta ao aumento da produção do NO por NOS2. Entretanto, outros dados da literatura também apontam que a expressão da p53 não mutada resulta na

regulação da expressão de NOS2 (AMBS et al. 1997). Com isto, supõe-se que há ligação entre o sítio promotor da proteína p53 com o gene responsável pela produção do NOS2. FORRESTER et al. (1996) publicaram experimentos em modelos de camundongos com p53 não mutado, os quais exibem altas concentrações de NO, produzido por NOS2. Essas altas concentrações de NO podem levar ao acúmulo de p53 não mutada, o qual promove a apoptose. Porém esse mecanismo de interação ainda não está esclarecido na literatura.

GALLO et al. (2003) estudou a associação entre NOS2, p53 e cox2 em 43 casos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCCs), *in vivo* e *in vitro*, e concluíram que possivelmente a mutação do p53 pode ser responsável pela alta regulação do NOS2 e cox2, freqüentemente observada nos HNSCCs. Em parte este trabalho corrobora com os achados desta dissertação, pois observou-se associação entre os antígenos p53 e cox2 no grupo das HF ($p= 0.015$), no entanto essa associação não foi observada no grupo dos LF ($p= 0.343$). Sabe-se que os macrófagos produzem altas concentrações de NO pela NOS2 (TAMIR et al. 1995) e que nas HF temos a presença de muitos macrófagos (CHAN e TSANG 1996). Talvez a presença destes macrófagos nas HF, podem produzir uma quantidade "extra" de NO em relação ao LF, e conseqüentemente levar ao acúmulo da p53 não mutada, a qual promove a apoptose. A apoptose está ativada nos centros germinativos hiperplásicos das HF (VAN EIJK et al. 2001).

Ao avaliar a correlação positiva entre os antígenos NOS2 e cox2, esses autores utilizaram diferentes tipos celulares. GALLO et al. (2003)

utilizaram tecido de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço; MARROGI et al. (2000), utilizaram linhagens de mesotelioma humanos e FANTAPPIE et al. (2002), utilizaram dois clones diferentes de linhagens de células de carcinoma hepatocelular. Também há outros trabalhos que relataram a correlação positiva entre NOS2 e p53 como: FORRESTER et al. (1996) utilizaram células de fígado humano AKN-1 e fibroblastos murinos, AMBS et al. (1998) utilizaram células de carcinoma HT-29 e BRENNAN et al. (2000) utilizaram carcinoma de células escamosas em modelo animal. A ação do NO é tipo celular dependente (KIM et al. 2001). Essa observação talvez explique a não correlação entre NOS2/p53 e NOS2/cox2 observada nesta dissertação.

Nenhum fator único é responsável para regular a patogênese dos LF e HF. Fatores positivos e negativos podem estimular e inibir o mecanismo de apoptose que participa do processo formação destas duas entidades. Com base na discussão acima, torna-se claro que o papel do NO e de suas sintases é ainda, pouco compreendido. A sua produção por células tumorais, os seus efeitos ambíguos e a participação na progressão e desenvolvimento do câncer merecem mais estudos. Na literatura pouco se sabe a respeito de NO em neoplasias linfóides malignas. Esta dissertação demonstrou a expressão das isoformas de NOS, cox2 e p53 nos LF e nas HF. E observou associação entre os grupos LF e HF exceto para o antígeno cox2. O significado biológico deste achado ainda não está claro e pode envolver interações entre as vias estudadas (NOS2, cox2 e p53) ou com as outras não discutidas neste estudo, ou mesmo a presença de macrófagos nas HF. Talvez um estudo mais amplo faz-se necessário para melhor entender

esses mecanismos, mensurando o óxido nítrico produzido na célula e/ou ampliando o painel imunoistoquímico.

6 CONCLUSÕES

1. Tanto os LF quanto as HF expressam NOS1 c, NOS1 n, NOS2 e NOS3. Entretanto, se houve um predomínio de marcação nas hiperplasias nas três isoformas de NOS, sugere a participação do NO na apoptose do centro germinativo ativado.
2. Há uma associação entre os antígenos p53 e cox2 no grupo das HF, sendo mais uma evidência que a proteína p53 pode influenciar a via metabólica do cox2.
3. Há uma relação inversa entre a frequência da expressão de NOS2 e p53 na HF, enquanto que nos LF a expressão de p53 está aumentada, sugerindo que o NO pode participar na patogênese do LF.
4. A presença de macrófagos nas HF, pode ser responsável pela produção de NO "extra" em relação ao LF, possivelmente levando ao acúmulo da p53 não mutada e explicando o mecanismo de apoptose ativado nas HF.
5. A não associação entre os antígenos (NOS2 com p53 ou cox2) pode corroborar com a literatura, em que a ação de NO pode ser tipo celular dependente, pois há dados na literatura observando a associação entre esses antígenos em outros tecidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambs S, Hussain SP, Harris CC. Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. **FASEB J** 1997; 11:443-8.

Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. **Cancer Res** 1998; 58:334-41.

Ambs S, Bennett WP, Merriam WG, et al. Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:86-8.

Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 2003; 27:199-214.

Begnami MDFS. **Estudo da frequência da infecção pelo vírus Epstein-Barr em adenocarcinomas gástricos, sua relação com o ciclo celular e sínteses do óxido nítrico.** São Paulo; 2003 (Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente)

Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. **Toxicology** 2005; 208:177-92.

Bonetti A, Zaninelli M, Leone R, et al. bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. **Clin Cancer Res** 1998; 4:2331-6.

Brennan PA, Palacios-Callender M, Umar T, et al. Correlation between type II nitric oxide synthase and p53 expression in oral squamous cell carcinoma. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2000; 38:627-32.

Caelles C, Helmberg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. **Nature** 1994; 370:220-3.

Campos AHJFM. **A relação entre a expressão de sintases do óxido nítrico por células de Reed-Sternberg, apoptose e infecção pelo vírus Epstein-Barr no linfoma de Hodgkin**. São Paulo; 2005 (Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente).

Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **J Cell Physiol** 2002; 190:279-86.

Carr NJ, Emory TS, Sobin LH. Epithelial neoplasms of the appendix and colorectum: an analysis of cell proliferation, apoptosis, and expression of p53, CD44, bcl-2. **Arch Pathol Lab Med** 2002; 126:837-41.

Chan JKC, Tsang WYW. Reactive lymphadenopathies. In: Weiss LM, editor. **Pathology of lymph nodes**. New York: Churchill Livingstone; 1996. p.81-167.

Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. **Am J Gastroenterol** 1993; 88:174-86.

Chiou SK, Rao L, White E. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. **Mol Cell Biol** 1994; 14:4556-63.

Condon LT, Ashman JN, Ell SR, Stafford ND, Greenman J, Cawkwell L. Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance. **Int J Cancer** 2002; 100:472-5

Cooper K, Haffajee Z. bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma. **J Pathol** 1997; 182:307-10.

Di Nardo A, Benassi L, Magnoni C, Cossarizza A, Seidenari S, Giannetti A. Ceramide 2 (N-acetyl sphingosine) is associated with reduction in Bcl-2 protein levels by Western blotting and with apoptosis in cultured human keratinocytes. **Br J Dermatol** 2000; 143:491-7.

Dodd F, Limoges M, Boudreau RT, Rowden G, Murphy PR, Too CK. L-arginine inhibits apoptosis via a NO-dependent mechanism in Nb2 lymphoma cells. **J Cell Biochem** 2000; 77:624-34.

Dohadwala M, Luo J, Zhu L, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. **J Biol Chem** 2001; 276: 20809-12.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature** 1992; 356:215-21.

Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. **Blood** 2002; 99:409-26.

Fantappie O, Masini E, Sardi I, et al. The MDR phenotype is associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line. **Hepatology** 2002; 35:843-52.

Fischer SE. **Estudo da expressão das sintases do óxido nítrico, e proteínas associadas ao ciclo celular e apoptose, em lesões pré malignas e carcinomas epidermóides da boca.** São Paulo; 2003 (Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente)

Fonteh AN, LaPorte T, Swan D, McAlexander MA. A decrease in remodeling accounts for the accumulation of arachidonic acid in murine mast cells undergoing apoptosis. **J Biol Chem** 2001; 276:1439-49.

Forrester K, Ambs S, Lupold SE, et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:2442-7.

Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase: properties, cellular distribution and expressional control. **Biochem Pharmacol** 1995; 50:1321-32.

Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB J** 1998; 12:773-90.

Gallo O, Fabbroni V, Sardi I, Magnelli L, Boddi V, Franchi A. Correlation between nitric oxide and cyclooxygenase-2 pathways in head and neck squamous cell carcinomas. **Biochem Biophys Res Commun.** 2002; 299:517-24.

Gallo O, Schiavone N, Papucci L, et al. Down-regulation of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 pathways by p53 in squamous cell carcinoma. **Am J Pathol** 2003; 163:723-32.

Geske FJ, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. **Hum Pathol** 2001; 32:1029-38.

Harris NL. Morphologic, immunologic and genetic features of follicular lymphoma, and the problems of grading. In: Mason D, Harris NL, editors. **Human lymphoma: clinical implications of the REAL classification.** London: Springer Verlag; 1999. p.12.1-12.6.

Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RS, et al. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. **Hum Pathol** 2002; 33:968-74.

Hollowood K, Macartney JC. Reduced apoptotic cell death in follicular lymphoma. **J Pathol** 1991; 163:337-42.

Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, et al. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. **Mod Pathol** 2002; 15:1374-80.

Ichikawa A, Hotta T, Saito H. Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoma. **Leuk Lymphoma** 1993; 11:21-5.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:277-88.

Jaffe ES, Harris NL, Slein H, Vardiman JW. **Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue**. Lyon: IARC; 2001. *in press*.

Jahrsdorfer B, Jox R, Muhlenhoff L, et al. Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. **J Leukoc Biol** 2002; 72:83-92.

Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **Int Immunopharmacol** 2001; 1:1421-41.

Kimura M, Osumi S, Ogihara M. Stimulation of DNA synthesis and proliferation by prostaglandins in primary cultures of adult rat hepatocytes. **Eur J Pharmacol** 2000; 404:259-71.

Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **Lancet Oncol** 2001; 2:149-56.

Lebecque S, de Bouteiller O, Arpin C, Banchereau J, Liu YJ. Germinal center

founder cells display propensity for apoptosis before onset of somatic mutation. **J Exp Med** 1997; 185:563-71.

Li CQ, Robles AI, Hanigan CL, et al. Apoptotic signaling pathways induced by nitric oxide in human lymphoblastoid cells expressing wild-type or mutant p53. **Cancer Res.** 2004; 64: 3022-9.

Liu Y, Borchert GL, Phang JM. Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells. **J Biol Chem** 2004; 279:18694-700.

Maciel MS. **Tumores fibroepiteliais da mama: estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína p53, isoformas das sintases do óxido nítrico, fator de crescimento do endotélio vascular, fator de crescimento plaquetário e da galectina-3.** São Paulo; 2002 (Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente)

Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. **Cell** 1994; 79:1137-46.

Mano Y, Kikuchi Y, Yamamoto K, et al. Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. **Eur J Cancer.** 1999; 35:1214-9.

Marrogi A, Pass HI, Khan M, Metheny-Barlow LJ, Harris CC, Gerwin BI. Human mesothelioma samples overexpress both cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (NOS2): in vitro antiproliferative effects of a COX-2 inhibitor. **Cancer Res** 2000; 60:3696-700.

Mateo MS, Sanchez-Beato M, Martinez JC, Orfao A, Orradre JL, Piris MA. p53, Rb and bcl-2 expression during the cell cycle: a study in

phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes and microwave irradiated lymphoid tissue sections. **J Clin Pathol** 1995; 48:151-9.

Mei JM, Hord NG, Winterstein DF, Donald SP, Phang JM. Expression of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induced by nitric oxide in conditionally immortalized murine colonic epithelial cells. **FASEB J** 2000; 14:1188-201.

Mendes RV, Martins AR, de Nucci G, Murad F, Soares FA. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunoreactivity by B-cell non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma. **Histopathology** 2001; 39:172-8.

Morgan D, Murrau A, Hunt T, Nurse P. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science: 2002. Cancer: the molecular basis of the cancer-cell behavior; p.1007-8.

Moos PJ, Edes K, Fitzpatrick FA. Inactivation of wild-type p53 tumor suppressor by electrophilic prostaglandins. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97: 9215-20.

Musiatowicz M, Hassmann-Poznanska E, Musiatowicz B, Baltaziak M. The Bcl-2 protein expression in germinal centers of hypertrophied adenoids in children. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 2003; 67:1369-73.

Nahta R, Esteva FJ. Bcl-2 antisense oligonucleotides: a potential novel strategy for the treatment of breast cancer. **Semin Oncol** 2003;30:143-9.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature** 2000; 403:98-103.

Nakamura S, Akazawa K, Kinukawa N, Yao T, Tsuneyoshi M. Inverse correlation between the expression of bcl-2 and p53 proteins in primary gastric lymphoma. **Hum Pathol** 1996; 27:225-33.

Natwani BN, Harris NL, Weisenburger D, Issacson PG. Follicular lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Slein H, Vardinan JW, editors. **Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue**. Lyon: IARK; 2001. p.162-67.

Ong ST, Le Beau MM. Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. **Semin Oncol** 1998; 25: 447-60.

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell** 1996; 87:803-9.

Paes RAP, Vassalo J, Alves AC, et al. Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias dos tecidos hematopoiético e linfóide: proposta de padronização terminológica em língua portuguesa do grupo de hematologia da Sociedade Brasileira de Patologia. **J Bras Patologia** 2002; 38:237-9.

Peterson BA. Current treatment of follicular low-grade lymphomas. **Semin Oncol** 1999; 26:2-11.

Rao CV. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. **Mutat Res** 2004; 555:107-19.

Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. **Curr Opin Oncol** 1995;7:541-6.

Reed JC. Promise and problems of Bcl-2 antisense therapy. **J Natl Cancer**

Inst 1997; 89:988-90.

Reed CJ. Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. **Semin Hematol** 2000; 37:9-16.

Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. **Trends Mol Med** 2001; 7:314-9.

Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. **Exp Mol Pathol** 2001; 70:255-64.

Said JW, Barrera R, Shintaku IP, Nakamura H, Koeffler HP. Immunohistochemical analysis of p53 expression in malignant lymphomas. **Am J Pathol** 1992; 141:1343-8.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90:7240-4.

Santos RTM, Watanatsu A, Kanamura CT, Nonogaki S, Pinto GA. Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização "in situ". In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J, editores. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p.237-59.

Schultz DR, Harrington WJ, Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. **Semin Arthritis Rheum** 2003; 32:345-69.

Shaminie J, Peh SC, Tan J. p53 alterations in sequential biopsies of Asian follicular lymphoma: a study of immunohistochemical staining pattern and gene mutations by PCR-SSCP in paraffin-embedded tissues. **Pathology** 2005; 37:39-44.

Shen YH, Wang XL, Wilcken DE. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. **FEBS Lett** 1998; 433:125-31.

Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. **J Biol Chem** 2001; 276: 18075-81.

Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? **Eur Respir J** 1997; 10:699-707.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu Rev Biochem** 2000; 69:145-82.

Soares FA, Vassalo J, Paes RP. Sistema hemolinfopoético. In: Brasileiro G, editor. **Bogliolo patologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.709-61.

Soares FA. Classificação morfológica e aspectos histológicos principais dos linfomas não-Hodgkin. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editores. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu; 2001. p.627-43.

Soini Y, Kahlos K, Puhakka A, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. **Br J Cancer** 2000; 83:880-6.

Sun XM, Bratton SB, Butterworth M, MacFarlane M, Cohen GM. Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac /DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. **J Biol Chem** 2002; 277:11345-51.

- Tai YC, Tan JA, Peh SC. Higher frequency of p53 gene mutations in diffuse large B-cell lymphoma with MALT component. **Pathol Int** 2004; 54:811-8.
- Tamir S, deRojas-Walker T, Gal A, et al. Nitric oxide production in relation to spontaneous B-cell lymphoma and myositis in SJL mice. **Cancer Res** 1995; 55:4391-7.
- Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava SK, Baier LD, DuMaine J, Morrison AR. Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways: prostaglandin E2 negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin 1. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:12168-72.
- Tsai AL, Wei C, Kulmacz RJ. Interaction between nitric oxide and prostaglandin H synthase. **Arch Biochem Biophys** 1994; 313:367-72.
- Tatsuguchi A, Matsui K, Shinji Y, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with angiogenesis and apoptosis in gastric cancer tissue. **Hum Pathol** 2004; 35:488-95.
- van Eijk M, Defrance T, Hennino A, de Groot C. Death-receptor contribution to the germinal-center reaction. **Trends Immunol** 2001; 22:677-82.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell** 1997; 91:627-37.
- Viardot A, Barth TF, Moller P, Dohner H, Bentz M. Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. **Semin Cancer Biol** 2003; 13:183-90.
- von Knethen A, Brune B. Cyclooxygenase-2: an essential regulator of NO-mediated apoptosis. **FASEB J** 1997; 11:887-95.
- Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nat Rev**

Cancer 2002; 2:594-604.

Voutsadakis IA. Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma. **Acta Oncol** 2000; 39:151-6.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. **Cell** 1994; 78:343-52.

Wun T, McKnight H, Tuscano JM. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. **Leuk Res** 2004 ; 28:179-90.

ANEXOS

Anexo 1 - Técnica de imunoistoquímica:

- 1 Desparafinização dos cortes histológicos com 3um de espessura do material incluído em parafina e colocados em lâminas silanizadas por solução de 3 aminopropyltrirthosy-silano (Sigma R , A-3648, USA) e deixadas por 24 horas em estufa de 60 °C.
- 2 Duas passagens em xilol (60oc e em temperatura ambiente).
- 3 Seis passagens em etanol (a 100%, 95%, 80% e 70%) sendo três delas a 100%.
- 4 Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
- 5 Incubação em tampão citrato pH 6.0 em panela de pressão (Eterna R, Nigro).
- 6 Lavagem das lâminas em água corrente
- 7 Bloqueio da peroxidase endógena com H2O2 a 3% (água oxigenada 10 volumes), por 4 trocas.
- 8 Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
- 9 Lavagem das lâminas com solução salina tamponada com fosfatos(PBS-phosphate buffered saline) 10 mM pH 7.4 .
- 10 Incubação com anticorpo primário, diluído em título previamente estabelecido, em tampão PBS contendo albumina bovina BSA a 1% (SIGMA, A9647, USA) e azida sódica (NaN3) 0,1%, em câmara úmida (16 a 18 horas).
- 11 Lavagem em tampão PBS.
- 12 Incubação com anticorpo secundário biotinilado-reagente C,(Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABCCComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K492, Denmark) no título pré estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37 °C.
- 13 Lavagem em tampão PBS.
- 14 Incubação das lâminas com o complexo reagente A (Streptoavidin) no título de 1:200 e reagente B (Biotinylated peroxydase) no título de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37 °C.
- 15 Lavagem das lâminas em tampão PBS.

- 16 Incubação das lâminas em solução substrato cromógeno:
3,3'Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 60mg (SIGMA, D-5637), Dimetilsulfóxido (DMSO) 1ml; H₂O₂ a 6% (água oxigenada 20 volumes) 1ml; PBS 100ml (5min, 37°C, ao abrigo da luz).
- 17 Lavar em água corrente e água destilada.
- 18 Contracoloração com hematoxilina de Harris.
- 19 Lavar em água corrente e água destilada.
- 20 Imersão em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio a 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.
- 21 Desidratação (6 passagens em etanol a 50%, 80%, 95% e 100%, sendo 3 delas a 100%).
- 22 Montagem das lâminas em Entellan neu (MERCK, 1.07961, Germany).

Anexo 2 - Resultado da análise imunoistoquímica por anticorpo.

Legenda:

Coluna 1 :

Número do caso

Coluna 2:

1- Linfoma Folicular

2- Hiperplasia Linfóide de padrão folicular

Coluna 3, 5, 7, 9 e 11:

Resultado da media nas quatro observações

Coluna 4, 6, 8, 10 e 12:

Categorização dos resultados segundo o quadro 4 (1- negativo e 2 positivo)

Coluna 13 e 14:

1- positivo 2 - negativo

Cont Anexo3

Caso	Tipo	NOS1C	NOS1C b	NOS1N	NOS1N b	NOS 2	NOS 2 b	NOS 3	NOS3 b	COX2	COX2 b	bcl2	p53
1	1	6,75	2	8,50	2	1,50	1	12,00	2	0,25	1	1	1
2	1	6,50	2	7,25	2	0,50	1	10,25	2	0,50	1	1	1
3	1	4,00	1	3,00	1	0,00	1	9,00	2	0,00	1	1	2
4	1	5,50	2	4,50	1	1,00	1	10,00	2	2,25	2	1	1
5	1	5,50	2	5,75	2	4,00	1	12,00	2	1,50	1	1	1
6	1	5,50	2	5,50	2	3,00	1	12,00	2	1,75	1	1	2
7	1	2,75	1	3,50	1	4,00	1	12,00	2	2,33	2	1	1
8	1	5,50	2	5,00	1	4,50	1	12,00	2	6,00	3	1	2
9	1	8,25	2	8,00	2	4,50	1	12,00	2	3,00	2	1	1
10	1	7,50	2	6,75	2	5,50	2	12,00	2	3,50	2	1	1
11	1	9,50	2	8,75	2	6,00	2	12,00	2	4,50	2	1	1
12	1	9,00	2	8,75	2	4,50	1	11,00	2	4,50	2	1	1
13	1	3,00	1	3,00	1	3,50	1	12,00	2	1,67	1	1	2
14	1	4,75	1	5,50	2	4,00	1	12,00	2	3,75	2	1	2
15	1	7,50	2	8,00	2	4,50	1	11,25	2	5,25	2	1	1
16	1	7,50	2	8,25	2	2,50	1	12,00	2	2,67	2	1	1
17	1	5,75	2	5,50	2	1,50	1	11,25	2	0,67	1	1	1
18	1	8,25	2	7,50	2	2,00	1	12,00	2	0,67	1	1	1
19	1	7,00	2	6,75	2	3,00	1	12,00	2	6,67	3	1	1
20	1	5,75	2	6,50	2	2,50	1	12,00	2	1,00	1	1	2
21	1	6,25	2	5,25	2	3,00	1	11,25	2	2,00	1	1	1
22	1	6,75	2	7,00	2	3,25	1	10,50	2	2,33	2	1	1
23	1	10,00	2	10,00	2	8,00	2	11,00	2	7,25	3	1	2
24	1	4,25	1	4,25	1	2,00	1	9,00	2	0,00	1	1	2
25	1	8,00	2	8,25	2	4,00	1	12,00	2	4,67	2	1	1
26	1	8,25	2	8,00	2	5,00	1	12,00	2	5,00	2	1	1
27	1	5,00	1	4,50	1	4,00	1	12,00	2	3,00	2	1	2
28	1	2,75	1	3,50	1	2,50	1	12,00	2	2,75	2	1	2
29	1	7,50	2	8,25	2	5,00	1	12,00	2	3,50	2	1	1
30	1	6,75	2	5,25	2	2,00	1	12,00	2	0,00	1	1	2

Cont Anexo3

Caso	Tipo	NOS1C	NOS1C b	NOS1N	NOS1N b	NOS 2	NOS 2 b	NOS 3	NOS3 b	COX2	COX2 b	bcl2	p53
31	1	5,00	2	5,25	2	1,50	1	12,00	2	1,25	1	1	2
32	1	7,00	2	5,25	2	5,50	2	12,00	2	2,67	2	1	2
33	1	8,00	2	9,50	2	2,50	1	12,00	2	3,00	2	1	1
34	1	7,50	2	7,50	2	4,00	1	10,50	2	4,50	2	1	1
35	1	9,50	2	9,25	2	5,00	1	12,00	2	3,50	2	1	1
36	1	7,50	2	7,50	2	4,00	1	11,00	2	4,00	2	1	1
37	1	9,00	2	7,75	2	7,00	2	12,00	2	4,50	2	1	2
38	1	4,75	1	4,75	1	5,00	1	12,00	2	4,33	2	1	2
39	1	6,25	2	6,25	2	2,50	1	9,25	2	3,25	2	1	1
40	1	3,25	1	3,00	1	1,33	1	1,50	1	0,00	1	1	2
41	1	9,75	2	9,75	2	4,00	1	12,00	2	3,75	2	1	1
42	1	7,75	2	7,25	2	5,00	1	11,00	2	4,50	2	1	1
43	1	11,00	2	8,50	2	3,50	1	12,00	2	5,25	3	1	1
44	1	3,00	1	3,00	1	0,75	1	3,00	1	0,00	1	1	2
45	1	9,75	2	9,75	2	3,25	1	12,00	2	3,75	2	1	1
46	1	8,00	2	8,75	2	5,00	1	12,00	2	3,75	2	1	1
47	1	7,00	2	6,50	2	6,00	2	0,50	1	3,00	2	1	2
48	1	7,00	2	6,75	2	4,50	1	9,00	2	3,25	2	1	1
49	1	3,75	1	4,50	1	1,50	1	3,00	1	0,75	1	1	1
50	1	9,00	2	7,25	2	3,50	1	11,25	2	5,25	2	1	2
51	1	2,50	1	4,00	1	3,50	1	10,00	2	1,50	1	1	1
52	1	5,75	2	6,25	2	4,50	1	10,00	2	2,25	2	1	1
53	1	6,25	2	8,25	2	3,50	1	10,00	2	2,25	2	1	2
54	1	7,50	2	8,75	2	3,50	1	9,25	2	1,00	1	1	2
55	1	X	X	X	X	1,50	1	1,33	1	1,00	1	1	1
56	1	X	X	X	X	1,00	1	X	X	0,00	1	1	1
57	1	7,50	2	7,50	2	0,00	1	5,75	2	3,00	2	1	
58	1	7,50	2	7,50	2	4,00	1	9,00	2	1,75	1	1	1
59	1	6,25	2	7,00	2	9,50	2	7,00	2	2,00	2	1	1
60	1	8,75	2	8,75	2	2,50	1	12,00	2	3,50	2	1	1
61	1	5,50	2	5,75	2	0,50	1	5,00	1	1,67	1	1	2

Cont Anexo3

Caso	Tipo	NOS1C	NOS1C b	NOS1N	NOS1N b	NOS 2	NOS 2 b	NOS 3	NOS3 b	COX2	COX2 b	bcl2	p53
62	1	1,25	1	1,00	1	3,00	1	1,00	1	0,00	1	1	1
63	1	6,75	2	7,75	2	3,00	1	5,33	2	7,67	3	1	2
64	1	3,00	1	4,00	1	4,00	1	1,50	1	0,00	1	1	2
65	1	8,67	2	7,00	2	4,50	1	4,75	1	2,75	2	1	2
66	1	7,00	2	6,50	2	5,50	2	5,25	2	1,50	1	1	1
67	1	4,50	1	4,50	1	3,50	1	8,75	2	1,75	1	1	1
68	1	7,50	2	7,50	2	1,00	1	10,50	2	2,33	2	1	2
69	1	6,25	2	6,75	2	4,00	1	9,75	2	3,75	2	1	2
70	1	3,00	1	3,00	1	6,50	2	4,00	1	2,00	2	1	2
71	1	7,50	2	6,75	2	3,25	2	6,50	1	1,75	1	1	1
72	1	8,25	2	8,50	2	5,50	2	7,50	1	3,00	2	1	1
73	1	8,50	2	8,50	2	3,50	1	7,00	1	2,75	2	1	1
74	1	8,75	2	10,00	2	5,00	1	9,25	1	2,50	2	1	1
75	1	4,50	1	4,50	1	2,50	1	11,25	1	1,00	1	1	2
76	1	5,25	2	4,50	1	3,00	1	6,75	1	3,00	2	1	1
77	1	3,75	1	3,75	1	4,00	1	5,00	1	0,25	1	1	1
78	1	2,50	1	1,75	1	4,00	1	4,33	1	0,67	1	1	1
79	1	9,50	2	9,25	2	5,50	2	11,25	2	3,00	2	1	1
80	1	8,25	2	8,00	2	5,00	1	9,75	2	2,25	2	1	1
81	1	8,75	2	9,50	2	6,00	2	10,50	2	3,25	2	1	1
82	1	9,75	2	5,75	2	4,00	1	11,25	2	4,50	2	1	2
83	1	7,50	2	7,25	2	9,50	2	11,25	2	4,50	2	1	1
84	1	6,50	2	6,25	2	3,50	1	7,00	2	2,25	2	1	1
85	1	5,33	2	4,67	1	2,50	1	3,00	1	1,50	1	1	2
86	1	4,75	1	6,75	2	4,00	1	8,00	2	1,00	1	1	1
87	1	4,25	1	4,75	1	5,50	2	9,75	2	4,00	2	1	1
88	1	3,25	1	3,25	1	2,00	1	6,00	2	1,00	1	1	2
89	1	8,75	2	8,75	2	4,50	1	11,25	2	3,50	2	1	1
90	1	7,50	2	7,50	2	9,00	2	6,00	2	1,50	1	1	1
1	2	5,50	2	9,00	2	5,50	2	6,00	2	2,60	2	2	2
2	2	6,50	2	9,75	2	6,50	2	5,33	2	1,80	1	2	2

Cont Anexo3

Caso	Tipo	NOS1C	NOS1C b	NOS1N	NOS1N b	NOS 2	NOS 2 b	NOS 3	NOS3 b	COX2	COX2 b	bcl2	p53
3	2	7,00	2	10,50	2	7,00	2	5,67	2	2,60	2	2	2
4	2	7,50	2	10,50	2	7,50	2	5,33	2	3,40	2	2	2
5	2	7,00	2	10,50	2	7,00	2	5,20	2	3,60	2	2	2
6	2	7,50	2	9,75	2	7,50	2	6,00	2	4,00	2	2	2
7	2	7,00	2	9,75	2	7,00	2	6,33	2	4,00	2	2	2
8	2	9,00	2	12,00	2	9,00	2	6,67	2	6,00	3	2	1
9	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	5,60	3	2	1
10	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	4,40	2	2	2
11	2	7,50	2	12,00	2	7,50	2	6,33	2	3,40	2	2	2
12	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	3,20	2	2	2
13	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,33	2	4,60	2	2	2
14	2	7,50	2	10,50	2	7,50	2	6,33	2	5,20	3	2	2
15	2	8,00	2	11,25	2	8,00	2	6,00	2	4,20	2	2	2
16	2	6,00	2	9,25	2	6,00	2	4,67	1	1,40	1	2	2
17	2	6,75	2	11,25	2	6,75	2	5,67	2	1,60	1	2	2
18	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,00	2	2,00	2	2	2
19	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,50	2	2,00	2	2	2
20	2	7,50	2	10,50	2	7,50	2	6,00	2	3,00	2	2	2
21	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	8,00	2	3,60	2	2	2
22	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	5,20	3	2	2
23	2	8,50	2	11,25	2	8,50	2	6,00	2	4,20	2	2	2
24	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	6,00	3	2	1
25	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,33	2	5,20	3	2	2
26	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,33	2	7,00	3	2	2
27	2	6,00	2	9,00	2	8,00	2	6,67	2	5,50	3	2	2
28	2	7,00	2	10,50	2	7,00	2	6,00	2	5,40	3	2	2
29	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,33	2	6,00	3	2	2
30	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	5,00	2	2	2
31	2	7,50	2	10,50	2	7,50	2	6,33	2	5,60	3	2	2
32	2	4,25	1	8,67	2	5,67	2	5,67	2	0,20	1	2	2
33	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	5,67	2	1,20	1	2	2

Cont Anexo3

Caso	Tipo	NOS1C	NOS1C b	NOS1N	NOS1N b	NOS 2	NOS 2 b	NOS 3	NOS3 b	COX2	COX2 b	bcl2	p53
34	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	0,80	1	2	1
35	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	5,00	1	2,80	2	2	2
36	2	7,33	2	8,25	2	5,50	2	6,00	2	2,60	2	2	2
37	2	7,33	2	9,00	2	7,33	2	5,00	1	3,00	2	2	2
38	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,33	2	4,25	2	2	1
39	2	8,00	2	12,00	2	6,00	2	6,00	2	3,60	2	2	2
40	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	5,00	1	1,40	1	2	2
41	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	5,40	3	2	2
42	2	7,00	2	10,50	2	7,00	2	4,50	1	4,00	2	2	2
43	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	5,33	2	5,60	3	2	2
44	2	6,00	2	12,00	2	6,00	2	6,50	2	5,25	3	2	1
45	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	2,33	1	2,75	2	2	2
46	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	5,83	2	6,00	3	2	2
47	2	5,33	1	12,00	2	8,00	2	6,00	2	3,00	2	2	2
48	2	6,00	2	9,25	2	6,00	2	5,20	2	1,00	1	2	2
49	2	5,25	2	8,50	2	5,25	2	5,00	1	0,80	1	2	2
50	2	7,50	2	10,50	2	7,50	2	5,60	2	1,40	1	2	2
51	2	7,33	2	11,00	2	7,33	2	5,33	2	3,80	2	2	2
52	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	3,40	2	2	2
53	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	4,00	1	4,25	2	2	2
54	2	8,00	2	11,00	2	8,00	2	6,00	2	4,00	2	2	2
55	2	7,00	2	9,75	2	7,00	2	6,00	2	2,80	2	2	2
56	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,40	2	3,60	2	2	1
57	2	7,00	2	10,50	2	7,00	2	6,33	2	3,20	2	2	2
58	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,33	2	3,75	2	2	2
59	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,33	2	4,80	2	2	2
60	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,67	2	3,40	2	2	1
61	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,67	2	4,20	2	2	2
62	2	8,00	2	11,25	2	8,00	2	6,33	2	3,80	2	2	2
63	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,33	2	4,20	2	2	2
64	2	5,25	2	7,75	2	5,25	2	5,67	2	0,40	1	2	2

Cont Anexo3

Caso	Tipo	NOS1C	NOS1C b	NOS1N	NOS1N b	NOS 2	NOS 2 b	NOS 3	NOS3 b	COX2	COX2 b	bcl2	p53
65	2	5,25	2	7,50	2	5,25	2	5,33	2	0,40	1	2	2
66	2	6,75	2	10,50	2	6,75	2	6,00	2	0,40	1	2	2
67	2	6,67	2	9,00	2	6,67	2	5,60	2	1,80	1	2	2
68	2	8,50	2	10,50	2	8,50	2	6,00	2	2,40	2	2	2
69	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,00	2	3,40	2	2	2
70	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,33	2	3,00	2	2	2
71	2	7,33	2	11,00	2	7,33	2	6,00	2	3,75	2	2	2
72	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,33	2	3,60	2	2	2
73	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,33	2	4,20	2	2	2
74	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,00	2	3,40	2	2	2
75	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,33	2	4,00	2	2	2
76	2	8,00	2	12,00	2	6,00	2	6,00	2	3,80	2	2	2
77	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,33	2	4,20	2	2	2
78	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,67	2	4,80	2	2	2
79	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	7,00	2	4,00	2	2	2
80	2	5,50	2	8,50	2	5,50	2	6,33	2	0,40	1	2	2
81	2	5,50	2	7,00	2	5,50	2	6,33	2	1,00	1	2	1
82	2	5,50	2	7,50	2	5,50	2	5,00	1	1,25	1	2	2
83	2	6,25	2	9,75	2	6,25	2	6,00	2	1,40	1	2	2
84	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	4,67	1	2,80	2	2	2
85	2	7,33	2	8,25	2	5,50	2	5,00	1	2,60	2	2	2
86	2	6,50	2	9,75	2	6,50	2	6,33	2	3,20	2	2	2
87	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	3,40	2	2	2
88	2	5,33	2	10,50	2	5,33	2	3,00	1	1,50	2	2	2
89	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	5,60	2	4,00	1	2	2
90	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,00	2	3,60	2	2	2
91	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	6,00	2	4,20	2	2	2
92	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,33	2	4,40	2	2	2
93	2	1,00	1	3,33	1	0,75	1	8,20	2	0,00	1	2	2
94	2	2,00	1	4,50	1	2,00	1	7,50	2	0,00	1	2	2
95	2	2,67	1	4,67	1	2,67	1	11,00	2	0,00	1	2	2

Cont Anexo3

Caso	Tipo	NOS1C	NOS1C b	NOS1N	NOS1N b	NOS 2	NOS 2 b	NOS 3	NOS3 b	COX2	COX2 b	bcl2	p53
96	2	5,25	2	9,25	2	5,25	2	8,60	2	1,20	1	2	2
97	2	5,50	2	7,50	2	5,50	2	11,50	2	1,20	1	2	2
98	2	7,50	2	10,50	2	7,50	2	10,50	2	2,60	2	2	2
99	2	4,50	1	7,50	2	4,50	1	11,00	2	2,80	2	2	2
100	2	4,00	1	4,00	1	4,00	1	6,60	2	1,25	1	2	2
101	2	6,00	2	9,75	2	6,00	2	12,00	2	0,00	1	2	2
102	2	4,25	1	5,00	1	4,25	1	5,67	2	1,00	1	2	2
103	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	12,00	2	6,00	3	2	2
104	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	12,00	2	2,40	2	2	2
105	2	7,00	2	10,50	2	7,00	2	8,20	2	1,00	1	2	2
106	2	6,50	2	8,75	2	6,50	2	12,00	2	4,80	2	2	2
107	2	7,50	2	10,50	2	7,50	2	9,00	2	1,20	1	2	2
108	2	8,00	2	12,00	2	8,00	2	12,00	2	2,20	1	2	2
109	2	5,00	1	7,25	2	5,00	2	12,00	2	0,00	1	2	2
110	2	6,75	2	5,75	2	6,75	2	9,00	2	0,40	1	2	2
111	2	4,00	1	5,50	2	4,00	1	9,00	2	0,40	1	2	2
112	2	1,25	1	6,25	2	4,25	1	11,00	2	1,20	1	2	2
113	2	7,50	2	10,50	2	7,50	2	10,00	2	0,00	1	2	2
114	2	5,50	2	11,00	2	7,33	2	12,00	2	2,25	2	2	2
115	2	6,50	2	9,00	2	6,50	2	7,50	2	0,20	1	2	2
116	2	7,50	2	12,00	2	7,50	2	12,00	2	2,00	2	2	2
117	2	7,00	2	11,00	2	9,33	2	11,50	2	2,20	2	2	2
118	2	6,50	2	9,00	2	6,50	2	9,00	2	1,75	1	2	2
119	2	5,50	2	8,25	2	5,50	1	11,00	2	2,40	2	2	2
120	2	6,00	2	8,25	2	6,00	2	12,00	2	7,80	3	2	2
121	2	5,00	2	6,00	2	5,00	1	9,50	2	1,80	1	2	2
122	2	7,00	2	9,75	2	7,00	2	11,00	2	2,40	2	2	2
123	2	5,50	2	7,25	2	5,50	1	12,00	2	0,80	1	2	2
124	2	6,00	2	7,75	2	6,00	2	11,50	2	0,80	1	2	2
125	2	5,50	2	8,50	2	5,50	2	10,50	2	0,25	1	2	2
126	2	5,75	2	9,00	2	5,75	2	11,50	2	0,60	1	2	2

Cont Anexo3

Caso	Tipo	NOS1C	NOS1C b	NOS1N	NOS1N b	NOS 2	NOS 2 b	NOS 3	NOS3 b	COX2	COX2 b	bcl2	p53
127	2	3,25	1	8,00	2	3,25	1	6,75	2	0,25	1	2	2
128	2	4,25	1	9,00	2	4,25	1	4,50	2	0,00	1	2	2
129	2	5,25	2	8,25	2	5,25	2	8,40	2	1,75	1	2	2
130	2	0,00	1	0,00	1	X	X	9,00	2	0,50	1	2	2
131	2	3,50	1	5,25	2	4,67	1	6,00	2	0,50	1	2	2
132	2	6,50	2	9,75	2	6,50	2	10,00	2	4,50	2	2	2
133	2	4,00	1	9,00	2	6,00	2	6,00	2	1,00	1	2	2
134	2	0,00	1	0,00	1	X	X	X	X	0,00	1	2	
135	2	1,00	1	0,00	1	2,00	1	X	X	2,00	2	2	2
136	2	7,50	2	11,25	2	7,50	2	6,33	2	2,75	2	2	2
137	2	7,00	2	11,25	2	7,00	2	7,33	2	3,25	2	2	2