

**VALOR PROGNÓSTICO COMPARATIVO DE  
PARÂMETROS PATOLÓGICOS, CLÍNICOS E  
MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR  
EM LINFOMAS FOLICULARES**

**ANDRÉ HENRIQUE CREPALDI**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação da Fundação Antônio Prudente em  
Oncologia em Parceria com a Associação  
Matogrossense de Combate ao Câncer AMCC  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. José Vassalo**

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

**São Paulo**

**2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Crepaldi, André Henrique

**Valor prognóstico comparativo de parâmetros patológicos, clínicos e marcadores de proliferação celular em linfomas foliculares** / André Henrique

Crepaldi – São Paulo; 2018.

85p.

Dissertação(Mestrado)-Fundação Antônio Prudente em Parceria com a Associação Matogrossense de Combate ao Câncer AMCC

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

Orientador: José Vassalo

Descritores: 1. Linfoma Folicular/Lymphoma, Follicula. 2. Prognóstico/Prognosis. 3. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 4. Proliferação Celular/Cell Proliferation. 5. Linfoma não Hodgkin/Lymphoma, Non-Hodgkin

## DEDICATÓRIA

A minha mãe, educadora, modelo para a família e grande incentivadora da dedicação e crescimento com os estudos.

Ao meu amor, Patrice, companheira que me mantém sempre motivado para novas conquistas.

Aos meus filhos, sempre presentes, a que tenho muito orgulho, hoje seguindo suas próprias trilhas.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu mestre/orientador Dr. José Vassalo, pela paciência e dedicação em todos os momentos.

Ao Guilherme Rossi, amigo que conheci neste projeto, que muito auxiliou, jovem e dedicado, com um futuro brilhante pela frente.

A equipe do Laboratório de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center.

## RESUMO

Crepaldi AH. **Valor prognóstico comparativo de parâmetros patológicos, clínicos e marcadores de proliferação celular em linfomas foliculares.** São Paulo; 2018. [Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (MINTER) em Oncologia, Fundação Antônio Prudente em Parceria com a Associação Matogrossense de Combate ao Câncer AMCC].

O linfoma folicular (LF) é um dos tipos mais frequentes de linfomas não-Hodgkin, correspondendo a cerca de 35% destes. O prognóstico destas neoplasias baseia-se em parâmetros clínicos e laboratoriais, que resultam em um índice utilizado internacionalmente, de aplicação relativamente fácil, o FLIPI (abreviatura do inglês, *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*). O objetivo deste estudo retrospectivo foi determinar o valor prognóstico da imunexpressão de marcadores de proliferação celular: Ki-67 e Top-2a. Os prontuários de 170 pacientes foram revistos para obtenção dos dados clínicos e laboratoriais. Os preparados histológicos foram revistos e graduados em baixo grau (graus 1 ou 2 da OMS) e alto grau (grau 3a ou 3b). Posteriormente, foram submetidos à construção de um microarranjo de tecidos (*tissue microarray*) e à imunoistoquímica. A avaliação da imunexpressão desses marcadores foi quantitativa [número de células positivas por  $\mu\text{m}^2$ ]. Os dados obtidos pela quantificação imunoistoquímica dos marcadores de proliferação celular foram relacionados com o grau histológico atribuído classicamente, com o FLIPI, a sobrevida global, sobrevida livre de doença e o risco de transformação para linfoma agressivo. Foi observado que os pacientes com Ki-67 $>$  ou = a 7 apresentaram menor sobrevida comparados aos que apresentaram Ki-67 $<$ 7. Obtivemos também correlação positiva fraca entre Ki-67 e Top-2a. A Top-2a não demonstrou relação com a sobrevida global e a sobrevida livre da doença. Conclui-se que apenas a Ki-67 pode ser um promissor fator prognóstico para LF estabelecida através da sua relação com a sobrevida.

## SUMMARY

Crepaldi AH. **Comparative prognosis value of pathological, clinical parameters and markers of cellular proliferation in follicular lymphomas.** São Paulo; 2018. [Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (MINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com a Associação Matogrossense de Combate ao Câncer AMCC].

Follicular lymphoma (FL) is one of the most common types of non-Hodgkin's lymphoma, accounting about 35%. The prognosis of these neoplasms are based in clinical and laboratory parameters, which result in an internationally index used, relatively easy to use, FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index). The aim of this retrospective study is to determine the prognosis value of immunoexpression of cell proliferation markers: Ki-67 and Top-2a. Patient records of 170 patients were reviewed for clinical and laboratory data. Histological preparations were reviewed and graded in low grade (WHO grade 1 or 2) and high grade (grade 3a or 3b). Subsequently, they were submitted for the construction of a tissue microarray and immunohistochemistry. The immunoexpression evaluation of these markers was quantitative [number of positive cells per  $\mu\text{m}^2$ ]. The data obtained by the immunohistochemical quantification of the cell proliferation markers were related to the histological grade classically attributed to FLIPI, overall survival, disease-free survival rate and the risk of transformation to aggressive lymphoma. It was observed that patients with Ki-67  $\geq 7$  showed lower survival compared to those with Ki-67  $< 7$ . We also obtained a weak positive correlation between Ki-67 and Top-2a. Top-2a no showed relation to overall survival rate and disease free survival rate. It is concluded that only Ki-67 may be a promising prognostic factor for FL established through its relation with survival rate.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Ilustração do sistema linfático humano.....	4
<b>Figura 2</b>	Distribuição da incidência do linfoma não Hodgkin na região Sudeste do Brasil.....	7
<b>Figura 3</b>	Características celular e molecular do centro germinativo (CG)	16
<b>Figura 4</b>	As quatro fases do ciclo celular .....	28
<b>Figura 5</b>	Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevida em pacientes com linfoma folicular segundo o uso de manutenção com imunobiológicos.....	53
<b>Figura 6</b>	Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevida em pacientes com linfoma folicular segundo a presença do marcador de proliferação celular Ki-67.....	58
<b>Figura 7</b>	Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevida em pacientes com linfoma folicular segundo a presença do marcador de proliferação celular Top-2a .....	58
<b>Figura 8</b>	Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevida em pacientes com linfoma folicular com $Ki67 \geq 7$ segundo a utilização de manutenção com imunobiológicos .....	59
<b>Figura 9</b>	Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevida em pacientes com linfoma folicular segundo a classificação do FLIPI.....	60
<b>Figura 10</b>	Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de permanecer sem progressão segundo a presença de sintomas B.....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Alguns subtipos de linfoma e frequência .....	5
<b>Tabela 2</b>	Características clínicas e patológicas de pacientes com linfoma folicular .....	48
<b>Tabela 3</b>	Comparação estatística das medianas e respectivos intervalos interquartis dos marcadores de proliferação celular em pacientes com linfoma folicular .....	50
<b>Tabela 4</b>	Matriz de correlação das variáveis avaliadas em pacientes com linfoma folicular .....	50
<b>Tabela 5</b>	Risco relativo para ocorrência de óbito em pacientes com linfoma folicular segundo a presença das variáveis clínicas e patológicas .....	52
<b>Tabela 6</b>	Risco relativo para ocorrência de progressão tumoral em pacientes com linfoma folicular segundo a presença das variáveis clínicas e patológicas.....	54

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>Anti-CD20</b>	Anticorpo para o antígeno CD20
<b>BCL2</b>	<i>B-cell leukemia/lymphoma</i> (oncogene da leucemia/linfoma de células B)
<b>BCL6</b>	B-cell leukemia/lymphoma (oncogene da leucemia/linfoma de células B)
<b>BL</b>	<i>Burkitt Lymphoma</i> (Linfoma de Burkitt)
<b>CD 10</b>	<i>Cluster Differentiation 10</i> (Antígeno de leucócito - CD10)
<b>CD 21</b>	<i>Cluster Differentiation 21</i> (Antígeno de leucócito – CD21)
<b>CD 23</b>	<i>Cluster Differentiation 23</i> (Antígeno de leucócito – CD23)
<b>CdK</b>	Ciclina dependente de kinase
<b>CG</b>	Centro germinativo
<b>CLP</b>	Progenitor linfóide comum
<b>C-MYC</b>	Oncogenene c-MYC
<b>CRDF</b>	Células reticulares dendríticas foliculares
<b>DHL</b>	Desidrogenase lática
<b>DNA</b>	Ácido Desoxiribonucleico
<b>EBV</b>	Vírus Epstein-Barr
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>FDC</b>	Célula Dendrítica Folicular
<b>FLIPI</b>	<i>Follicular Lymphoma International Prognostic index</i>
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HTLV-1</b>	Vírus linfotrópico da célula T humana
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IG</b>	Imunoglobulina
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IP</b>	Índice proliferativo
<b>IQR</b>	Intervalo Interquartil

<b>Ki-67</b>	Antígeno nuclear - Ki-67
<b>LF</b>	Linfoma folicular
<b>LNH</b>	Linfoma Não Hodgkin
<b>LNHDGCB</b>	Linfoma Não Hodgkin difuso de grandes células B
<b>MALT</b>	Linfoma do tecido linfático associado a mucosa
<b>MCL</b>	Linfoma de células do Manto
<b>MZL</b>	Linfoma da zona marginal
<b>NK</b>	Células Natural Killer
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>p16NK4a</b>	Antígeno p16
<b>p21CIP1</b>	Antígeno p21
<b>p27KIP1</b>	Antígeno p27
<b>P53</b>	Proteína p53
<b>PBS</b>	Solução salina tampão fosfato
<b>PET</b>	Exame de imagem utiliza emissão de pósitrons e tomografia computadorizada
<b>RCB</b>	Receptor de células B
<b>R-CHOP</b>	Quimioterapia que utiliza as medicações: rituximabe, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona
<b>RR</b>	Risco relativo
<b>SG</b>	sobrevida global
<b>SHM</b>	Hipermutação somática
<b>SLP</b>	Sobrevida livre de progressão
<b>TC</b>	Tomografia Computadorizada
<b>Tfh</b>	Células T auxiliares foliculares
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento transformador β
<b>TLP</b>	Tempo livre de progressão
<b>TMA</b>	tissue microarray (microarranjo de tecidos)
<b>Top-2a</b>	Proteína topoisomerase 2 alfa
<b>TPX2</b>	Proteína associada ao microtúbulo TPX2

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1	Linfoma.....	4
2.2	Linfoma: aspectos epidemiológicos.....	6
2.3	Etiologia e fatores de risco .....	8
2.4	Prevenção .....	9
2.5	Linfoma Folicular .....	10
2.5.1	Patogênese .....	11
2.5.1.1	Origem de células do linfoma.....	14
2.5.1.2	Microambiente folicular .....	19
2.5.1.3	Transformação do linfoma folicular .....	21
2.5.2	Classificação .....	24
2.6	Proliferação celular e câncer .....	26
2.7	Marcadores de proliferação celular .....	31
2.7.1	Top-2a .....	31
2.7.2	ki-67.....	33
2.8	Fatores Prognóstico no Linfoma Folicular .....	35
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
4.1	Objetivo Geral.....	41
4.2	Objetivos Específicos .....	41
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
5.1	Amostra .....	42
5.2	Histologia.....	43
5.3	Imunohistoquímica .....	43

5.4	Dados clínicos .....	45
4.5	Análise estatística.....	46
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O linfoma folicular (LF) é um dos tipos mais frequentes de linfomas não-Hodgkin, correspondendo a cerca de 35% destes (MORTON et al. 2006). Trata-se de linfoma indolente, com estádios avançados ao diagnóstico, recidivas frequentes e sem platô de cura (ANDERSON et al. 1982). A patogênese molecular do LF é complexa, com várias etapas durante o processo no qual uma simples célula folicular B adquire todas as alterações epigenéticas e genéticas necessárias para transformação de malignidade. O tumor resultante é usualmente compreendido de uma mistura de centrócitos (pequenas células centro-foliculares clivadas) e centroblastos (grandes células centro-foliculares não clivadas).

A anormalidade cromossômica mais comum é a translocação do braço longo do cromossomo 18 e 14 t (14;18) (q32;q21), ocorrendo em 85% dos casos, resultando na superexpressão do oncogene BCL2 (B-cell leukemia/lymphoma, oncogene da leucemia/ linfoma de células B), cuja função é bloquear a apoptose (BLOOMFIELD et al. 1983; ROWLEY 1988).

A morbidade e mortalidade estão grandemente associadas à transformação para linfoma agressivo, o que ocorre em aproximadamente 13-28% dos casos, a uma taxa de 3% ao ano (MONTOTO et al. 2007; CONCONI et al. 2012). Enquanto os pacientes em estádios precoces têm melhor sobrevida, o mesmo não ocorre com aqueles em estádios avançados. Embora uma melhora na taxa de sobrevida tenha-se seguido ao

uso terapêutico do anti-CD20, ainda restam alguns pacientes que apresentam resposta insatisfatória após a imunoterapia e a quimioterapia (SEYMOUR et al. 2003; FISHER et al. 2005; LINK et al. 2009; MARTIN et al. 2013).

O prognóstico dos LF baseia-se em parâmetros clínicos e laboratoriais de uso internacional e aplicação relativamente fácil conhecido como FLIPI (abreviatura de Follicular Lymphoma International Prognostic Index). A primeira versão deste índice, FLIPI 1, foi publicada em 2004 e a segunda, FLIPI 2, em 2009 (SOLAL-CÉLIGNY et al. 2004; FEDERICO et al. 2009). Este índice leva em consideração os seguintes critérios: idade superior a 60 anos [FLIPI 1 e 2]; estádios III-IV [FLIPI1], ou envolvimento de medula óssea [FLIPI 2]; anemia, com Hb < 12 g/L [FLIPI 1 e 2]; número de áreas nodais envolvidas maior que 4 [FLIPI 1], ou linfonodos envolvidos com mais de 6 cm [FLIPI2]; DHL (desidrogenase láctica) maior que o limite superior da normalidade [FLIPI 1] ou Beta-2-microglobulina maior que o limite superior da normalidade [FLIPI 2] (SOLAL-CÉLIGNY et al. 2004; FEDERICO et al. 2009). No FLIPI, a presença de até no máximo um desses fatores confere ao paciente baixo risco, de até 2 fatores, risco intermediário e de 3 ou mais fatores, alto risco.

Estes parâmetros, porém, apresentam limitações no seu papel de predição da evolução do paciente, havendo necessidade de se buscar parâmetros biológicos mais precisos para prognóstico, especialmente para o Linfoma Folicular.

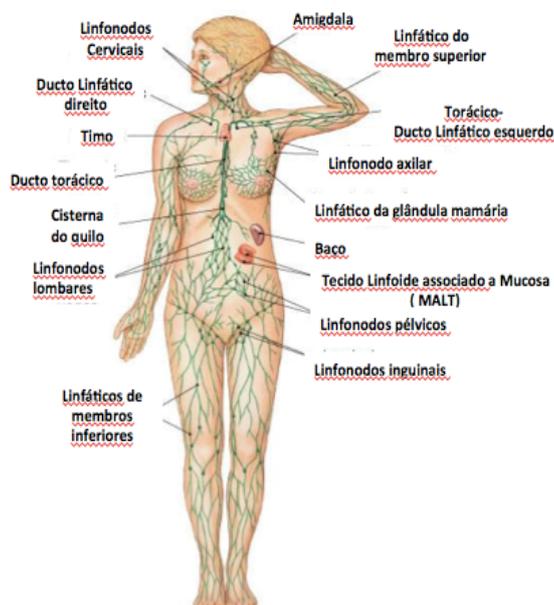
Assim, muitos estudos tem avaliado a aplicabilidade de alguns

marcadores de proliferação celular para o prognóstico, como o antígeno Ki67 e a enzima Topoisomerase 2a (Top-2a) em diferentes tipos de neoplasias, mas poucos testaram esses marcadores para o Linfoma Folicular (HALL et al. 1988; BRYANT et al. 2006; KALPADAKIS et al. 2007; DETERMANN et al. 2008; BROYDE et al. 2009; KLAPPER et al. 2009; NAZ et al. 2011; DHALL et al. 2012; HASHMI et al. 2014; HE et al. 2014; PAYANDEH et al. 2015; BERLIN et al. 2017; CIEPLIŃSKI et al. 2018).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 LINFOMA

Linfoma refere-se a um conjunto de doenças linfoproliferativas que possuem significativa heterogeneidade biológica e clínica. Todos os linfomas são originados nas células do sistema linfático, Figura 1, em qualquer um dos subtipos de células linfóides, tanto os linfócitos B, T ou Natural Killer (NK). Independente do estágio de maturação em que estão, podem sofrer transformação maligna (MUGNAINI e GHOSH 2016).



**Fonte:** <http://www.mundosemdor.com.br/alergia-alimentar-oculta-procedimentos-usados-no-diagnostico/>

**Figura 1** - Ilustração do sistema linfático humano

O linfoma não-Hodgkin (LNH) representa 90% dos casos de linfoma sendo o principais representante das neoplasias linfóides (ANSELL 2015; MUGNAINI e GHOSH 2016).

São derivados predominantemente de linfócitos B, e apenas 10% dos casos são originados de linfócitos T ou NK (Tabela 1). O linfoma não-Hodgkin possui poucas células inflamatórias e estromais no tecido tumoral, sendo a grande maioria das células clonais derivadas de um precursor linfóide comum que sofreu transformação neoplásica (MUGNAINI e GHOSH 2016).

**Tabela 1** - Alguns subtipos de linfoma e frequência.

SUBTIPOS DE LINFOMA	Frequência (%)
Linfoma não Hodgkin	90
<i>Célula B</i>	
DLBCL (Linfoma Difuso de células B)	25-30
Linfoma folicular	20
Linfoma de zona marginal extranodal de tecido linfóide associado a mucosa	7
Leucemia linfocítica crônica/Linfoma linfocítico pequeno	7
Linfoma de células do Manto	6
Linfoma de Burkitt	1
<i>Células T/Natural Killer</i>	9
Vírus Epstein-Barr positivo de células-T doença linfoproliferativa infantil	—
Linfoma de Hodgkin	10
Clássico	10
Não clássico	-

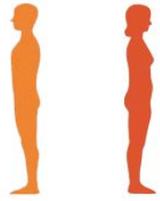
**Fonte:** MUGNAINI e GHOSH (2016).

## 2.2 LINFOMA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O risco para o desenvolvimento do linfoma não Hodgkin (LNH) aumenta com a idade assim como a maioria dos cânceres. Os homens têm um risco duas vezes maior do que as mulheres. Nos Estados Unidos, os linfomas não Hodgkin (LNH) são o quinto tipo de câncer mais comum, com mais de 65.540 novos casos e 20.210 mortes estimadas em 2010 sendo a sobrevida global em cinco anos de 68 % (THOLSTRUP et al. 2011; National Cancer Institute National Institute of Health-NCI 2017). No Brasil, os LNH respondem por cerca de 2,45% de todos os tumores malignos diagnosticados, excluindo-se o câncer de pele não/melanótico. O número estimado de novos casos da doença em 2018, no Brasil, é de 10.180, sendo 5.370 novos casos de linfoma não Hodgkin em homens e 4.810 em mulheres (Ministério da Saúde 2018).

Esses valores corresponderam a um risco estimado de 5,19 novos casos a cada 100 mil homens e 4,55 para cada 100 mil mulheres.

Dados nacionais sobre a prevalência dos diferentes subtipos de LNH são escassos, mas estatísticas internacionais mostram que entre 22% e 40% dos LNH são linfomas foliculares (LF), diagnosticados com idade entre 60 e 65 anos (THOLSTRUP et al. 2011).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	30.080	31,0%		Mama Feminina	30.880	32,6%	
Cólon e Reto	10.040	10,4%		Cólon e Reto	10.600	11,2%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	8.290	8,6%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	5.650	6,0%	
Cavidade Oral	5.920	6,1%		Colo do Útero	4.420	4,7%	
Estômago	5.800	6,0%		Glândula Tireoide	4.330	4,6%	
Bexiga	3.720	3,8%		Corpo do Útero	3.400	3,6%	
Esôfago	3.460	3,6%		Estômago	3.280	3,5%	
Laringe	2.620	2,7%		Ovário	2.850	3,0%	
Linfoma não Hodgkin	2.610	2,7%		Linfoma não Hodgkin	2.530	2,7%	
Leucemias	2.500	2,6%		Sistema Nervoso Central	2.450	2,6%	

\* Números arredondados para múltiplos de 10

**Fonte:** Ministério da Saúde (2018)

**Figura 2 -** Distribuição da incidência do linfoma não Hodgkin na região Sudeste do Brasil.

No ano de 2012, foram estimados cerca de 390 mil casos novos (2,7% do total de câncer) e 200 mil óbitos (2,4% do total de óbitos) por LNH no mundo. Desses, cerca de 50% dos casos de incidência e 67% dos óbitos ocorrem em regiões menos desenvolvidas, refletindo assim uma sobrevida baixa da doença nesta população. As maiores taxas de incidência encontram-se na América do Norte, Austrália, Nova Zelândia e em algumas partes de Europa. No continente africano, as taxas de incidência de LNH são baixas, o que pode ser um reflexo da subnotificação, exceto na região da África subsaariana, onde as crianças são mais propensas a desenvolver LNH, principalmente o linfoma de Burkitt, que é causado pela infecção do vírus Epstein-Barr (EBV). Além do EBV, outras infecções como por HIV, H. pylori, vírus da hepatite C e vírus linfotrópico para células T do tipo 1, estão associadas a um maior risco no desenvolvimento dos LNH. A infecção por H. pylori aumenta o risco de linfoma gástrico, conferindo aproximadamente 5% de todos os LNH encontram-se no estômago (THOLSTRUP et al. 2011).

O histórico do comportamento das taxas de incidência e da

mortalidade do LNH foi de crescimento a partir do ano de 1990, em ambos os sexos, em todo o mundo. Esse cenário mudou depois da melhoria terapêutica da doença, tornando estável a tendência das taxas de incidência e a queda nas taxas de mortalidade nos países desenvolvidos a partir de 2006. (NATIONAL CANCER INSTITUTE, SEER 2018).

### **2.3 ETIOLOGIA E FATORES DE RISCO**

Para a maioria dos casos de linfoma, geralmente a etiologia não é identificada, mas acredita-se que fatores ambientais, ocupacionais (incluem herbicidas e pesticidas), dietéticos e hereditários possam estar envolvidos (FISHER et al. 2005). Os linfócitos são células do sistema imunológico, por isso mudanças importantes no sistema imune parecem ter papel importante em muitos casos de linfoma. Assim, os possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de linfoma são: 1) Pessoas com deficiências imunológicas têm maior risco de desenvolver linfoma; 2) infecções crônicas, aumenta o risco de desenvolver linfoma, já que o sistema imunológico está constantemente produzindo novos linfócitos para combater a infecção o que aumenta as chances de erros em seu DNA e 3) certas doenças autoimunes (Ministério da Saúde 2018).

Pessoas acometidas por imunodeficiência hereditária, como hipogamaglobulinemia, imunodeficiência comum variável, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxiateleangiectasia têm até 25% de risco de desenvolver LNH (FILIPOVICH et al. 1992).

Agentes infecciosos também têm sido implicados na gênese do LNH específicos, incluindo o vírus do Epstein-Barr, vírus linfotrópico de células T humano tipo 1, herpes vírus tipo 8, vírus da hepatite C, vírus simiano 4011 e a bactéria *Helicobacter pylori* (ARAÚJO et al. 2008).

## **2.4 PREVENÇÃO**

Para a maioria dos casos de Linfoma não Hodgkin, alguns dos fatores de riscos não podem ser alterados, o que inviabiliza uma prevenção efetiva. O que se pode e deve ser feito é reduzir o risco de desenvolvimento através da prevenção de fatores de risco evitáveis, como por exemplo a deficiência imunológica, a propagação do vírus de células T da leucemia/linfoma (HTLV-1), o tratamento adequado de infecções bacterianas relacionadas como fator de risco ao LNH, como Epstein-Barr e *Helicobacter pylori*, respectivamente (FISHER et al. 2005; ROMAN e SMITH 2011).

Outro fator de risco que vem sendo estudado e que pode ser evitado são os tratamentos de radioterapia e quimioterapia para outros tipos de neoplasias, assim como o uso de drogas imunossupressoras, no caso de transplantes. Apesar do pequeno risco do desenvolvimento de LNH a longo prazo, os benefícios desses tratamentos ainda compensam (FISHER et al. 2005; ROMAN e SMITH 2011).

Fatores ambientais também vem sendo estudados, como por exemplo o alto consumo de gordura e carnes, assim como o excesso de peso e a obesidade, mas ainda se faz necessário mais pesquisa para que

estes fatores possam ser incluídos como risco para LNH (OLIVEIRA e MARTINS 2013).

## **2.5 LINFOMA FOLICULAR**

O linfoma folicular (LF) é um dos tipos mais frequentes de linfomas não-Hodgkin, correspondendo a cerca de 35% destes (MORTON et al. 2006). Trata-se de linfoma indolente, com estádios avançados ao diagnóstico, recidivas frequentes e sem platô de cura (ANDERSON et al. 1982). A patogênese molecular é complexa, com várias etapas para transformação maligna. É multistepo e uma única célula folicular adquire alteração gênica e epigênica necessária para transformação neoplásica. A anormalidade cromossômica mais comum é a translocação do braço longo do cromossomo 14 e 18  $t(14;18)(q32;q21)$ , ocorrendo em 85% dos casos, resultando na superexpressão do oncogene BCL2 (*B-cell leukemia/lymphoma*, oncogene da leucemia/ linfoma de células B), cuja função é bloquear a apoptose (BLOOMFIELD et al. 1983; ROWLEY 1988; LOSSOS et al. 2003).

### **2.5.1 Patogênese**

O linfoma folicular (LF) é o segundo linfoma nodal mais comum e ocorre, geralmente, em torno dos 60 anos de idade. Apesar do fato de que a maioria dos pacientes apresentam doenças muitas vezes disseminadas no diagnóstico, e também pelo fato do LF ser, geralmente, considerado

incurável, é um tipo de linfoma indolente. É caracterizado por progressão lenta e altas taxas de resposta à terapia. Assim, a sobrevida global atinge 10 anos ou mais com as terapias atuais. No entanto, muitos pacientes acabam por desenvolver resistência ao longo do tempo e, em até 13-28% dos casos, com risco de 3% ao ano, o linfoma indolente se transforma em um subtipo agressivo, associado a um pior prognóstico (KRIDEL et al. 2012).

Os linfomas de baixo grau caracterizam-se pelo baixo índice de proliferação celular, por apresentarem células de tamanho pequeno, formação de massas linfonodais grandes e pelo envolvimento frequente da medula óssea e de sítios extranodais. São tumores menos agressivos e mesmo sem tratamento específico, garantem sobrevida de anos ao paciente, dependendo do estágio da doença. Os linfomas indolentes têm relação com alterações na regulação da apoptose, com consequente acúmulo celular (SÁNCHEZ-BEATO et al. 2003). Em todos os casos, devido às características insidiosas e muitas vezes assintomáticas do crescimento de LF, os pacientes são frequentemente diagnosticados em estágio avançado (III / IV).

Os linfomas de alto grau, por outro lado, possuem alto índice de proliferação celular, com células grandes, linfonodomegalias localizadas, alta agressividade, com sobrevida de semanas a meses se não tratados. Neste tipo de linfoma, predominam as alterações na regulação do ciclo celular, como BCL-6 (Linfoma de células B-6) e C-MYC (codificador de proteínas), que estão, frequentemente, em associação com as alterações na apoptose (SÁNCHEZ-BEATO et al. 2003).

As estratégias terapêuticas disponíveis, portanto, têm que lidar com um tumor amplamente disseminado e resistente à remissão completa (RC) a longo prazo. Apesar do progresso no tratamento, em parte devido a regimes de combinação, incluindo anticorpos monoclonais como o rituximabe, não há provas conclusivas de que essas abordagens possam erradicar completamente as células tumorais. Portanto o LF permanece incurável, ou, na melhor das hipóteses, será convertido terapêuticamente em uma doença crônica. De acordo com o curso clínico, a análise molecular do tumor em diferentes pontos do tempo da progressão da doença demonstrou que a linfomagenese segue um processo *multi-hit* complexo. (MAMESSIER et al. 2014).

São considerados linfomas de alto grau o linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B (LNHDGCB), o linfoma folicular pouco diferenciado (grau 3), o linfoma de células T periférico, o linfoma de grandes células anaplásico e o linfoma de Burkitt. Parte destas neoplasias podem desenvolver alterações adicionais no ciclo celular, as quais frequentemente afetam os inibidores de enzimas quinase dependentes de ciclina, como p16INK4a, p21CIP1 e p27KIP1. A inativação dessas enzimas está relacionada com a determinação da alta agressividade e da maior resistência ao tratamento, independente do grau histológico (SÁNCHEZ-BEATO et al. 2003).

Sendo assim, morfológicamente, LF é definida como uma proliferação de células B do centro germinativo (CGBs) que ficam misturadas com células não-malignas, como as células T, células dendríticas foliculares

(FDCs) e macrófagos, cujos homólogos normais, isto é, centrócitos e centroblastos, representam os tipos de células predominantes da reação do centro germinativo (KRIDEL et al. 2012, 2015).

Diferente de outras doenças malignas, a classificação da LF não proporciona um impacto prognóstico claro e nem existe um consenso sobre a natureza do grau 3B LF, já que esses casos geralmente se assemelham ao *de novo* linfoma de células B difusas (DLBCL) e apresentam características moleculares diferentes do que os graus 1-3A LF (por exemplo, grau 3B LF é muitas vezes negativo para t (14; 18) e expressa de forma variável CD10). O padrão de crescimento folicular clássico da LF pode ser revelado por coloração para marcadores FDC, como CD21 ou CD23. A translocação t (14; 18) (q32; q21) pode ser detectada por hibridação fluorescente in situ e em 85% dos casos, resulta em superexpressão de BCL-2 anti-apoptótico, considerado um marcador molecular da doença. No entanto, esta translocação não é necessária nem suficiente para o diagnóstico, pois está ausente em 15% de LFs e presente em cerca de 20% a 30% de DLBCLs tipo GCB.

#### **2.5.1.1 Origem de Células do Linfoma**

As células expressam moléculas denominadas antígenos, que as identificam. As moléculas conhecidas como CD (cluster of differentiation), são identificadas por anticorpos monoclonais ou policlonais. A classificação e estudo dos linfócitos T e B foi possível através do conhecimento dessas moléculas, tanto nos processos fisiológicos como nos neoplásicos. As

células B são linfócitos que conferem imunidade adaptativa eficiente e de longa duração devido à formação de anticorpos com alta afinidade contra antígenos. São essenciais na resposta imune humoral com papel central na memória imunológica. Além disso, os linfócitos B participam de uma ampla gama de funções imunológicas, incluindo apresentação de antígenos, regulação imunológica e fornecimento de um repertório pré-imune celular e humoral, sendo sua contribuição para o sistema imunológico muito complexa (SEIFERT et al. 2013).

O desenvolvimento de células B é iniciado na fase fetal, no fígado, passando para a medula óssea durante o processo de maturação dos embriões de mamíferos. Ao longo dos processos de diferenciação, o microambiente desse tecido (o nicho microambiental) desempenha papel essencial no fornecimento de nutrição, sobrevivência e estímulos de desenvolvimento. As células-tronco hematopoiéticas multipotentes dão origem a precursores linfóides que iniciam um programa de diferenciação irreversível. Deste modo, o desenvolvimento de células B, a partir de precursores linfóides, é orquestrado por vários fatores-chave de transcrição que determinam o destino das células B (Figura 3) (SEIFERT et al. 2013).

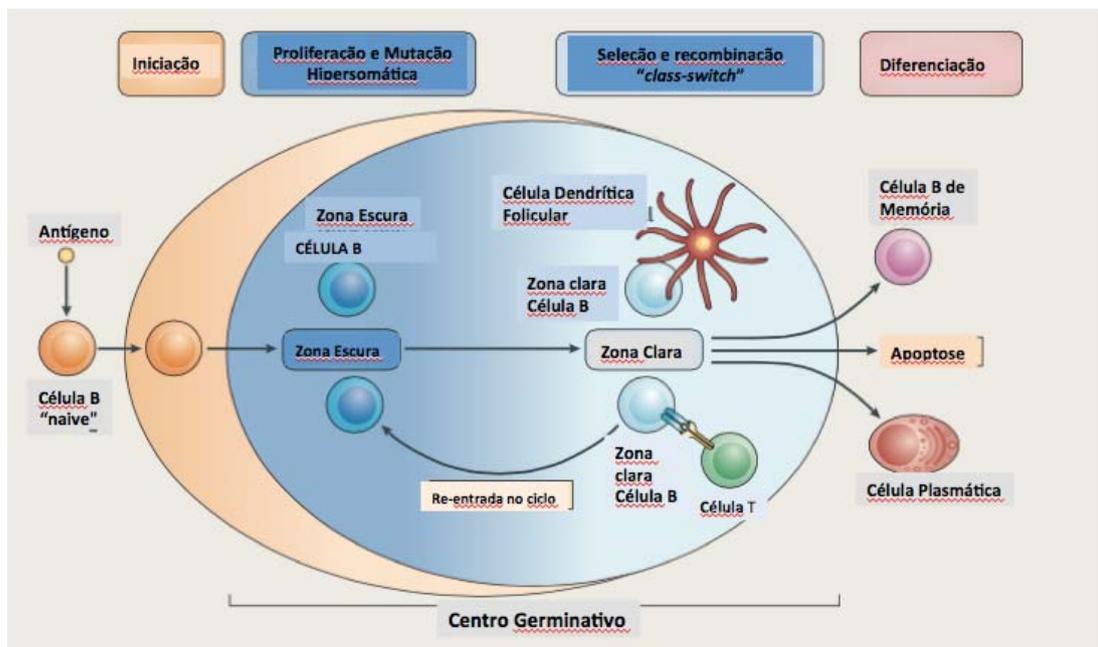
Os centros germinativos (CGs) são as estruturas histológicas dedicadas à geração e a seleção de células B que produzem anticorpos de alta afinidade (BASSO e DALLA-FAVERA 2015). A função imunológica fundamental do CG vem com uma desvantagem perigosa: os mesmos mecanismos genéticos que permitem o desenvolvimento de receptores de imunoglobulina de alta afinidade e de diferentes classes de isotipo, estão

envolvidos na transformação maligna das células B. De fato, as células CG B representam o mesmo estágio de desenvolvimento encontrado na maioria dos linfomas de células B maduras. Essa afirmação vem das observações de que as células neoplásicas estão organizadas em folículos e que expressam marcadores de superfície do centro germinal (CG) como BCL-6 (linfoma de células B-6) e CD10 além de possuírem perfil característico de expressão de genes de centrócitos e / ou centroblastos (KRIDEL et al. 2012).

Deste modo, com base na definição clássica da histologia do centro germinativo, sua estrutura compreende a zona escura, a qual, quase que exclusivamente, contém alta proliferação das células B. Já a zona clara, as células B estão misturadas com células dendríticas folicular, células T e também macrófagos. As células B que passaram com sucesso pela recombinação V(D)J (mecanismo genético que recombina o loci da imunoglobulina para adicionar um gene variável (V), um gene de diversidade (D) e um gene que unirá todos (J) e que expressam receptores funcionais para células B), migram como células B naive, que por sua vez se torna ativada com a interação das células T CD4 na área rica em células T no tecido linfóide e, se agregam dentro dos folículos primários para formar o centro germinativo (KRIDEL et al. 2012).

Neste centro, as células B são alvos do processo de remodelamento do gene da imunoglobulina - hipermutação somática (SHM) e recombinação *class-switch*. Como consequência da reação CG ocorre a formação de células plasmáticas e células B responsáveis pela memória imunológica. A

formação dessas células só pôde ser elucidada devido ao entendimento de que o CG é funcionalmente polarizado: a zona escura é o sítio de divisão de células B e SHM, e na zona clara ocorre a ativação das células B e selecção com base na afinidade com seus receptores. Além disso, a maturação das células B não segue um único caminho entre os dois compartimentos, em vez disso, envolve re-entradas cíclicas em que as células CG, após a selecção na zona clara, retorna a zona escura para mais uma rodada da SHM e divisão celular (KRIDEL et al. 2012) (Figura 3).



Fonte: Modificado de BASSO e DALLA-FAVERA (2015)

**Figura 3** - Características celular e molecular do centro germinativo (CG).

Portanto, o linfoma folicular, provavelmente, resulta da transformação maligna de células B maduras envolvendo a proliferação desregulada de células B-like no centro germinativo em órgãos linfóides. A característica

mais recorrente do LF é o processo de recombinação que envolve a translocação t (14; 18) (q32;q21), correspondendo a > 85% casos e envolve o proto-oncogene de linfoma B 2 (BCL2) (no cromossomo 18) e o alelo IGH (locus da imunoglobulina de cadeia pesada) não expresso (no cromossomo 14). Como consequência, o gene BCL2 passa a ser controlado por potenciadores de IGH, causando a expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2. Então, a translocação t (14;18) passa a representar o primeiro evento oncogênico de LF. A translocação ocorre no início do desenvolvimento de células B em células pré-B, devido a um erro de reparo durante o processo de recombinação V(D)J.(MAMESSIER et al. 2014; BASSO e DALLA-FAVERA 2015).

Essa transformação maligna tardia representa o produto do desacoplamento entre o evento oncogênico molecular e sua atividade oncogênica. Um dos motivos fundamentais desse desacoplamento é que o BCL2 já está sendo expressa em praticamente todos os subconjuntos de células B normais, com exceção dos dois principais subconjuntos de células CG-B - centroblastos e centrócitos (BASSO e DALLA-FAVERA 2015).

A reação no CG visa aumentar a afinidade do receptor de células B (BCR) com os antígenos, através de um processo mutagênico aleatório denominado hipermutação somática (SHM) e que são direcionados aos loci IGH/L. As células B do centro germinal que sofrem SHM aumentam ou diminuem de forma aleatória sua afinidade ao receptor. Apenas aquelas com maior afinidade ao BCR serão selecionadas para sobreviver e se diferenciar ainda mais. O gene BCL2 é então *down-regulated* nas células CGB a fim

de "sensibilizar" células B para a apoptose, como forma de eliminar células B inúteis e potencialmente perigosas, que apresentam baixa afinidade ao BCR ou sofreram alguma modificação. Quando as células B carregadoras do t (14;18) entram no CG, através de um padrão antigênico, a expressão de BCL2 interrompe o processo de seleção, permitindo a sobrevivência de células B t (14;18) positivas, independentemente da sua afinidade ao BCR (MAMESSIER et al. 2014; BASSO e DALLA-FAVERA 2015).

Essas células B com BCR funcional selecionado são as chamadas células B maduras e ingênuas e coexpressam IgM (Imunoglobulina M) e IgD (Imunoglobulina D). Através de rearranjo dos genes das imunoglobulinas e da expressão das diferentes classes de imunoglobulinas de superfície (Igs), têm origem as células B naive. As células B naive são pequenos linfócitos que circulam no sangue periférico e também ocupam os folículos linfóides primários e as zonas do manto folicular. Expressam frequentemente CD20, CD5, CD23, IgMs e IgDs. Com a exposição das células B naive a antígenos, estas sofrem transformação blástica, proliferação e maturação, dando origem às células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas e células B de memória. Portanto, os LF são proliferações clonais de células B em seus diversos estágios de diferenciação que aparentemente possuem um CG intacto com atividade ativa da SHM. No entanto sua patogênese é conduzida pela importante alteração da expressão do BCL2, com causa na translocação cromossomal (MAMESSIER et al. 2014; BASSO e DALLA-FAVERA 2015).

### 2.5.1.2 Microambiente Folicular

Na década de 1990, houve a introdução rotineira da imunohistoquímica, para LF. Desde então, partir do trabalho de diagnóstico diário, soube-se que as células T não malignas são responsáveis por grande parte do volume tumoral, com infiltração de até 50% da massa celular no LF e algumas vezes relacionada ao prognóstico (CARRERAS et al. 2006). Foi também identificada a presença de células dendríticas foliculares, macrófagos, microvasculatura e mastócitos. No entanto, os estudos clínico-patológicos visando compreender as variações no comportamento clínico e para identificar os fatores prognósticos têm sido mais focados nos aspectos genéticos. Deste modo, várias alterações genéticas incluindo a translocação t (14; 18), ocorrem frequentemente e algumas delas estão correlacionadas com a sobrevivência (JONG e FEST 2011).

Sabe-se que para um anticorpo de alta afinidade ser formado, as células B devem receber ajuda cognitiva das células TFH (células T auxiliares foliculares) durante a reação do CG. Quando as células T estão ausentes durante a iniciação das células B por DCs (células dendríticas) seguidas por FDCs (células dendríticas folicular), as células B serão direcionadas para a apoptose. As células TFH produzem citocinas (incluindo CD40L, IL-21 (interleucina 21) e IL-4 (interleucina 4)) para que a troca de classe de anticorpos ocorra. Também produzem altos níveis de quimiocinas CXCL13 juntamente com as FDCs garantindo a migração de células B para dentro do CG onde sofrem maturação. Por outro lado, se isso não ocorrer, as células B irão produzir ICOS-L (co-estimulador de células T indutíveis)

enquanto que o FDC, durante o desenvolvimento da reação CG, produz fatores que garantem o recrutamento e a sobrevivência das células B além de concentrarem antígenos formando o BCR . Células hematopoiéticas presentes durante a reação CG possuem funções específicas como a apresentação de antígenos para DC e macrófagos, resposta imune inata para macrófagos, células NK (natural killer) e células T GD e resposta imune adaptativa para células CD8 e Treg (JONG e FEST 2011).

Durante o processo de desenvolvimento da malignidade folicular ocorrem mudanças específicas no microambiente induzidas diretamente pelas células B com translocação 14:18 ou indiretamente por subconjuntos de células emergentes, incluindo Treg que atenuam a função das células T CD8. Vale ressaltar que o TFH está altamente presente no LF e eles aumentam a produção de IL-4 sustentando a sobrevivência das células B. Já os FDCs modificam a liberação de seus fatores em resposta, juntamente com células LF B, mas também através de outros subconjuntos de células que apresentam perturbações significativas, como macrófagos. As células LF B com BCL2 apresentam modificações específicas, incluindo o complexo de membrana BCR e sua sinalização secundária (JONG e FEST 2011).

Com a progressão da doença ocorrem grandes modificações no panorama dos tumores. As células B passam a apresentar instabilidade genética que levam a várias modificações da função celular, incluindo um sinal BCR constitutivo. Ao mesmo tempo ocorre o desaparecimento das células pertencentes à reação normal do CG (TFH, FDC, células T CD8 e outras), e células de estroma. Por outro lado, aparecem macrófagos

associados a tumores (TAM) em resposta a sinais de estresse, construindo um microambiente específico da agressividade tumoral, incluindo a promoção da angiogênese (JONG e FEST 2011; CARBONE et al. 2012; TAKATA et al. 2014).

### **2.5.1.3 Transformação do Linfoma Folicular**

O linfoma folicular é a forma mais comum de linfoma não-Hodgkin indolente. O tratamento com uso da incorporação do anticorpo monoclonal anti-CD20, rituximab, tem promovido melhora na sobrevida global em até 90% em 5 anos. Por outro lado, muitos pacientes apresentam um padrão recidivante e recorrente no qual a doença, eventualmente, torna-se resistente a terapia adicional. Esses pacientes incluem um subgrupo de alto risco, propensos a transformação para um agressivo e um subgrupo de prognóstico reservado, que progride ou recai dentro de 2 anos após receber tratamento de primeira linha, com sobrevida inferior ao grupo controle (CASULO et al. 2015; MAURER et al. 2016; KORFI et al. 2017).

O linfoma transformado tem sido considerado de difícil tratamento, e está associado a um mau prognóstico. Nos últimos anos, a utilização do conhecimento em torno das mudanças genéticas que, impulsionam o processo de transformação, tem levado ao desenvolvimento e à aplicação de novas terapias específicas. Existe uma necessidade de novas terapias para alguns pacientes com linfoma transformado, porque muitas das aberrações genéticas observadas não tem drogas alvo específicas, como CDKN2A, MYC ou perda de TP53 (ARAF et al. 2016; KORFI et al. 2017).

Apesar de 85% a 90% do LF caracterizar-se pela translocação t (14; 18), isoladamente não é suficiente para a transformação maligna, já que a translocação é detectada em indivíduos saudáveis e que não chegam a desenvolver a doença (ROULLAND et al. 2006). É interessante notar que entre 10% a 15% dos casos de LF não apresentam a translocação de t (14; 18), sendo que os mecanismos patogênicos que levam ao desenvolvimento deste subconjunto de LF permanecem amplamente desconhecidos (KORFI et al. 2017). Deste modo, estudos têm sido realizados para tentar identificar os "hits" adicionais que contribuem com t (14; 18) na indução da transformação maligna em células GC B (GLAS et al. 2007).

Estudos envolvendo associação genômica, análises citogenéticas, expressão gênica e perfil dos microRNA têm demonstrado a existência de alterações cromossômicas, incluindo genes do microambiente tumoral, como 1p36 e perda de 6q além da associação com variantes do gene *HLA* dentre vários outros (KORFI et al. 2017). Apesar dessas alterações presentes no LF, com o avanço da técnica de sequenciamento, outras mudanças têm sido identificadas. Dentre elas mutações de genes envolvidos no controle imunológico, desenvolvimento de células B, vias de sinalização da BCR-NFkB (fator de transcrição nuclear kappa B) e a na via de sinalização da Janus kinase/transdutores de sinal e ativadores de transcrição (JAK/STAT) sendo esta, a principal via de sinalização de citocinas e fatores de crescimento.

Além disso, foram identificadas muitas mutações em vários modificadores epigenéticos como o CREBBP (Proteína de ligação ao

CREB), EP300, EZH2, KMT2, vários membros do complexo de remodelamento do nucleossomo (SWI/SNF), bem como nas famílias dos membros ligantes de histona H1 e H2. No entanto, o que distingue LF é sua aparente inclinação às alterações epigenéticas, com lesões em modificadores epigenéticos que ocorrem em quase todos os pacientes. Além disso, perda de função no LF devido as mutações de CREBBP parecem facilitar a evasão imunológica mediante a minimização da expressão do MHC de classe II, associada à redução na infiltração de células T. Essas mutações inativantes também podem contribuir para a linfomagenese prejudicando a acetilação de proteínas não histônicas p53 e BCL6 (VOGELSTEIN et al. 2000; MENENDEZ et al. 2009; PASQUALUCCI et al. 2012).

Um modelo prognóstico chamado m7-FLIPI, que utiliza o estado mutacional de sete genes (EZH2, ARID1A, MEF2B, EP300, FOXO1, CREBBP e CARD11), associado ao FLIPI e performace estado ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) foi criando buscando identificar grupo de pior prognóstico no LF. No estudo prospectivo GLSG2000 com 107 pacientes foi identificado dois grupos : alto risco (22% dos pacientes), com sobrevida livre de progressão de 25% ; e baixo risco (78% dos pacientes), com sobrevida livre de progressão de 68%. É um modelo, que quando incorporado na prática na clínica, poderá extratificar melhor os pacientes com LF ( PASTORE et al. 2015; JURINOVIC et al. 2016).

Mais recentemente, a análise global de metilação do DNA das células B do linfoma folicular revelou hipermetilação de genes Polycomb-suppressed

(uma família de proteínas que podem remodelar a cromatina de forma que o silenciamento epigenético dos genes ocorra) e hipometilação de regiões de heterocromatina em comparação com células CG B normais. A programação anormal de metilação de DNA em LF pode potencialmente cooperar com as mutações somáticas subjacentes em, por exemplo, modificadores de cromatina para fixar a regulação transcricional dinâmica normal dos genes de diferenciação de células B (KRETZMER et al. 2015; ARAF et al. 2016).

### **2.5.2 Classificação**

A classificação mais utilizada é a da Organização Mundial da Saúde (OMS). Essa classificação está baseada em dados morfológicos, genéticos, informações clínicas e imunofenotipagem. Assim, divide-se os tipos de neoplasias linfoides em neoplasias de células B, neoplasias de células T/NK, linfoma de Hodgkin, desordem linfoproliferativa pós transplante e neoplasia de células dendríticas e histiocíticas (HARRIS et al. 1999; SWERDLOW et al. 2016). Essa é considerada a classificação mais ampla, pois inclui os novos conhecimentos e cria subgrupos. Segundo esta classificação existem dois grupos principais de LNH: os de células B e os de células T, cada um subdividido em linfoma de células primordiais ou precursoras e de células periféricas ou maduras (HARRIS et al. 1999; SWERDLOW et al. 2016).

Assim, como estratégia de identificação e classificação dos linfomas não-Hodgkin, levando em conta a sua progressão, localização e disseminação são usados os seguintes critérios (HARRIS et al. 1999; SWERDLOW et al. 2016)):

- 1 **Classificação:** Indica se o Linfoma não-Hodgkin é indolente (baixo grau ou de crescimento lento) ou agressivo (alto grau ou de crescimento rápido);
- 2 **Tipo:** Compreende mais de 50 subtipos, em função do aspecto das células;
- 3 **Estadio:** Indica a localização e extensão do linfoma. O estadio (I, II, III ou IV) atribuído de acordo com o local acometido: gânglios linfáticos ou outros órgãos e tecidos.

Os estadios considerados no linfoma não-Hodgkin são (HARRIS et al. 1999):

- 1 **Estadio I:** as células de linfoma encontram-se apenas num grupo de gânglios linfáticos;
- 2 **Estadio II:** as células de linfoma encontram-se em, pelo menos, dois grupos de gânglios linfáticos do mesmo lado do diafragma (abaixo ou acima), ou as células de linfoma estão num órgão e nos gânglios linfáticos vizinhos desse órgão, do mesmo lado do diafragma. Pode haver células de linfoma em outros grupos de gânglios linfáticos, do mesmo lado do diafragma;
- 3 **Estadio III:** o linfoma encontra-se em grupos de gânglios linfáticos, acima e abaixo do diafragma. Também pode ser encontrado num órgão ou tecido vizinho destes grupos de gânglios linfáticos;

- 4 **Estadio IV:** o linfoma encontra-se disseminado em, pelo menos, todo um órgão ou tecido (adicionalmente aos gânglios linfáticos), ou encontra-se no fígado, sangue ou medula óssea.

A presença de sintomas B, definidos como presença de febre maior que 38 graus Celsius, emagrecimento inexplicado de 10% do peso em seis meses e sudorese noturna, confere um prognóstico pior a estes pacientes. Para definição da extensão das doenças é necessário, além da História e exame físico, a realização de exames de diagnósticos auxiliares, como imagem (Raio X, Tomografias Computadorizadas, Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons- PET-CT), e exames invasivos como biópsias e exames de sangue. Assim, com as informações de classificação, tipo e estágio pode-se diagnosticar o paciente e assim planejar adequadamente o tratamento (HARRIS et al. 1999).

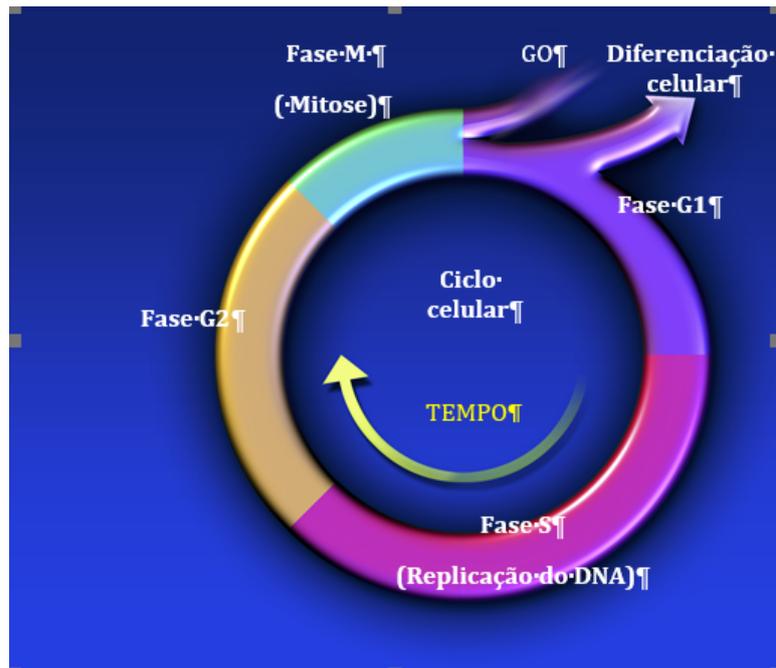
## **2.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR E CÂNCER**

A proliferação celular é o processo final que determina a diferenciação das células, determinando o ciclo de vida dela através de uma célula nova. Em célula eucariótica o ciclo celular é fundamental para a manutenção da vida da célula, afinal em organismo multicelulares, células morrem e duplicam a todo instante. No entanto, nem todas as células podem entrar em apoptose a cada injúria ambiental danosa para o organismo, pois desta forma morreríamos (ALBERTS et al. 2010).

Desta forma, o ciclo celular é um processo necessário para a

manutenção da vida da célula. Além dos aspectos bioquímicos necessários para a sua ativação, há a necessidade do controle do ambiente, garantindo a reposição de novas células com o início do ciclo celular, ou se não houver necessidade, o ciclo celular não é iniciado e a células entram em apoptose. Este processo acontece através das ciclinas kinases (Cdk) que se ligam a ciclinas, formando um complexo ciclina-cdk e que fosforilam algumas proteínas para iniciar o processo de replicação do DNA (ALBERTS et al. 2010).

O ciclo celular è dividido em quatro fases: G1, S, G2, e M. A fase S é a fase de replicação do DNA, e a fase M a fase de mitose da célula, que gerará duas células com os mesmos cromossomos. Antes da fase S, tem uma fase de desenvolvimento da célula (G1) e, antes da fase M tem a outra fase de desenvolvimento (G2), fases importantes para a preparação da célula para a divisão propriamente dita. As fases G1, S, e G2 fazem parte da fase chamada intérfase, que dura 23h das 24h do ciclo celular (ALBERTS et al. 2010).



**Figura 4** - As quatro fases do ciclo celular.

No entanto, nem todas as células entram na intérfase, pois o ambiente sinalizará a necessidade ou não de uma nova célula. Deste modo, as células entram na fase de quiescência que está representada, no ciclo celular, pela fase G0. Para que isto ocorra, há uma proteína upstream que inibe a atividade das cdks sendo considerada controladora do ciclo celular (ALBERTS et al. 2010). Esta proteína chamada p53, estimula proteínas inibidoras do complexo ciclinas-cdk como a proteína p21, que por sua vez inibe as ciclinas-cdks. A p53 é sempre recrutada quando ocorre dano ao DNA. Desta forma, ela ativa a p21 que inibe o ciclo e também direciona a célula para a via da apoptose (OREN 2003; MAXIMOV e MAXIMOV 2008; ALBERTS et al. 2010).

Um dano ao DNA é muito perigoso, podendo levar ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer conferindo a p53 grande

importância. Além disso, um dos fatores que também pode levar ao desenvolvimento do câncer é o dano por estresse. Este faz com que ocorra um aumento da proteína p53 para tentar combater o desenvolvimento da doença. No entanto, mutações do gene p53 que codifica a p53 também pode levar ao desenvolvimento do câncer, devido a perda de controle do ciclo celular (PETITJEAN et al. 2007; KIM et al. 2009).

O câncer é uma doença que além de proliferar células defeituosas, ainda faz a sua própria manutenção metabólica. É uma doença multifatorial, mas entre os fatores existentes, um pode estar relacionado a síntese de seus próprios fatores de crescimento, fazendo assim sinalização autócrina e estimulando o crescimento e desenvolvimento desta célula, com suas respectivas sinalizações metabólicas (HANAHAN e WEINBERG 2011). O microambiente tumoral garante o desenvolvimento e crescimento das células, pela diminuição dos sinais de apoptose através da inibição da p53 (responsável pela inibição da proliferação celular e estímulo da apoptose) (KIM et al. 2009; HANAHAN e WEINBERG 2011; PAMPALONA et al. 2012).

## 2.7 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

### 2.7.1 Top-2a

A estrutura terciária em dupla hélice do DNA é a característica que mais se destaca nessa proteína. Esta conformação espacial poderia afetar de alguma forma o processo de replicação celular, visto que para que a transcrição do DNA ocorra faz-se necessário a separação das duas cadeias complementares que o formam. Essa separação ocorre através de um stress torcional, gerando a forquilha de replicação e tendo como consequência a ocorrência de superenrolamentos positivos ou negativos na molécula de DNA (BURDEN e OSHERO 1998; KELLNER et al. 2002; PROVENCIO et al. 2003).

Os superenrolamentos positivos são responsáveis pela inibição da transcrição e os superenrolamentos negativos estão relacionados a formação de estruturas anormais de DNA. Existem enzimas que possuem a capacidade de alterar este estado topológico, preservando a integridade genômica, relaxando e desembaraçando as cadeias de DNA. Essas enzimas são chamadas de topoisomerases, das quais o subtipo 2 alfa (Top-2a) tem se destacado pela sua relação com a proliferação celular (BURDEN e OSHERO 1998; KELLNER et al. 2002; PROVENCIO et al. 2003).

A Topoisomerase II $\alpha$  (Top II $\alpha$  ou Top-2a) é uma enzima nuclear, ubitiquitária, multifuncional fundamental nos processos de replicação, mitose e outros eventos moleculares, devido a sua capacidade de alterar a conformação do DNA (WANG et al. 1997; BURDEN e OSHERO 1998). A

Top-2a reduz o enrolamento e a torção do DNA, cortando a dupla hélice e religando para facilitar a replicação do DNA, importante na segregação e condensação da divisão das células.

Nas células em proliferação de mamífero, sua expressão é variável de acordo com o ciclo celular. Ao final da fase G1, a Top-2a já pode ser detectada, aumentando sua expressão ao final da fase S, fase G2 e M, e diminuindo ao final da fase M (BURDEN e OSHERO 1998; KELLNER et al. 2002; PROVENCIO et al. 2003; BRIZOVA et al. 2010). Assim, podemos afirmar que sua expressão está alta na fase G2/M do ciclo celular, sendo uma fase de crescimento exponencial (YAN et al. 2015).

Importante destacar que em caso de dano ao DNA, decorrente de uma ação defeituosa da Top-2a ocorre a ação da p53. Como visto, essa proteína regulatória age bloqueando o ciclo celular, através de processos de sinalização, nos pontos de checagem da fase G1/S (Gap – intervalo / Synthesis -síntese), que irá impedir formação de células anômalas. Esse reparo ou indução à apoptose desencadeada pela p53 possui vários mecanismos e diferentes fatores podem induzi-la a gerar essa respostas (ZÖRNIG et al. 2001; BROOKS e GU 2003; MAXIMOV e MAXIMOV 2008).

Devido a sua importante participação no ciclo celular, e pelo fato de que no câncer sua concentração poder estar elevada, pesquisas têm estudado o papel da Top-2a como fator prognóstico clínico (WANG et al. 1997; LOHRI et al. 1997; BURDEN e OSHERO 1998; DINGEMANS et al. 1998; KELLNER et al. 2002; PROVENCIO et al. 2003; KORKOLOPOULOU e VASSILAKOPOULOS 2004; TIEMANN et al. 2005; DOUSSIS-

ANAGNOSTOPOULOU et al. 2008; ZOLA 2009; BRIZOVA et al. 2010; BAR et al. 2012; ASHOUR et al. 2015; PERES et al. 2016; CIEPLÍŃSKI et al. 2018). Em alguns destes estudos, a enzima Top-2a tem servido de marcador de proliferação celular no câncer, pois garante a proliferação da célula tumoral.

A Top-2a também é alvo terapêutico de vários fármacos utilizados em quimioterapia, que inibem a sua função enzimática, em tumores do sistema hematopoiético (WANG et al. 1997; BURDEN e OSHERO 1998). Ela também é alvo de drogas inibidoras de sua ação, frequentemente usado em tratamento de quimioterapia com a doxorrubicina, que age promovendo a inibição da atividade polimerase da replicação do DNA, e também formando um complexo com o DNA inibindo a atividade das Topisomerases; assim como da Vincristina que inibe a fusão do microtubulos do fuso mitótico inibindo assim a mitose (HEROLD et al. 2003; YAMAMOTO et al. 2013; PEDERSEN et al. 2015). Portanto, as drogas anti-Top-2a tem ação na interação com o DNA impedindo a replicação (RODY et al. 2009; PEDERSEN et al. 2015). No câncer a Top2a pode estar elevada dependendo do tipo de perda do controle do ciclo celular. Sua atividade inicia na fase S e tem um pico de concentração na fase G2 e M. Além disso, estudos em câncer de mama tem encontrado uma relação entre o aumento da expressão da Top-2A com a diminuição da sobrevida livre de doença (RODY et al. 2009; YAN et al. 2015).

### 2.7.2 ki-67

Na década de 1980, o Ki-67 foi identificado como um antígeno nuclear associado à proliferação. Ele pode ser detectado no processo de divisão celular em algumas fases (G1-, S-, G2 e M-fase) não sendo detectado nas células quiescentes (fase G0). Seus níveis variam de acordo com a fase do ciclo celular, sendo baixo nas fases G1 e S com pico no início da mitose e uma diminuição acentuada após a mitose (LI et al. 2015). Sua expressão está relacionada com a mitose celular, sofrendo fosforilação e desfosforilação durante essa fase. A sua quantidade é regulada por um ajuste preciso entre a sua síntese e degradação, sinalizado pela sua meia vida, que é de uma a uma hora e meia (SCHOLZEN e GERDES 2000; RAHMANZADEH et al. 2007; LI et al. 2015).

A literatura tem feito referência ao papel protetor do Ki-67 para o comportamento biológico das neoplasias malignas, uma vez que sua presença, de acordo com a quantidade, fornece informações sobre a síntese do DNA na neoplasia. Importante lembrar que a presença do Ki-67 não é exclusividade das neoplasias malignas, ela de fato está mais predominante em relação às benignas, podendo ser um marcador de transformação (SCHOLZEN e GERDES 2000; RAHMANZADEH et al. 2007; TANG et al. 2009; YERUSHALMI et al. 2010; NAZ et al. 2011; TADBIR et al. 2012; WAHLIN et al. 2012; PAYANDEH et al. 2015; BERLIN et al. 2017; JIANG et al. 2017).

Neste contexto, a fosfoproteína nuclear p53 possui uma série de funções regulatórias no desenvolvimento celular e, é expressa a partir de um

gene regulador chave do ciclo celular que, ao sofrer mutações, pode levar ao desencadeamento de neoplasias malignas. Essa proteína, em situações de normalidade, tem um papel importante nas vias carcinogênicas em diferentes tecidos, pois atua como um supressor tumoral através de um bloqueio à proliferação tumoral (PARK et al. 2007). A via de atuação mais importante da p53 é a inibição da replicação do DNA, motivo pelo qual é conhecida como molécula de “*check-point*” da progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S e da fase G para fase M (CHEN et al. 2003; JANSSEN et al. 2008).

A correlação do Ki67 com a expressão da p53 tem sido verificada em estudos com diferentes tipos de neoplasias. Entretanto, como a expressão dessa proteína pode afetar a expressão do gene Ki67 ainda não está totalmente esclarecida. Uma hipótese de mecanismo regulatório de transcrição é a ação inibitória da p53 na transcrição de genes nos sítios de ligação ao DNA: o Sp1 (proteína específica Sp1), o qual o Ki-67 possui três desses sítios de ligação (LI et al. 2015). Além disso, a expressão de Ki-67, tem sido relacionada com a iniciação, progressão, metástase e prognóstico de vários tipos de tumores (YERUSHALMI et al. 2010; LI et al. 2015). Resultados previos demonstraram uma significativa expressão da Ki67 em tecidos malignos comparado aos tecidos normais (LI et al. 2015).

A relação entre a expressão de Ki-67 com alguns subtipos de linfoma ainda é contraditória e inconclusiva. Alguns estudos correlacionam uma alta expressão de Ki-67 a uma menor sobrevida, outros apresentaram uma correlação inversa e houve estudos que não conseguiram observar relação

entre a Ki-67 e sobrevida (JERKEMAN et al. 2004; LI et al. 2013; HE et al. 2014). Essas observações tão diferenciadas podem estar relacionadas ao fato de que os estudos sobre Ki-67, como marcador, estão baseados em métodos laboratoriais e estatísticos variáveis entre si. Este fato associado à grande variedade de neoplasias e as suas particularidades, tem dificultado o estabelecimento deste marcador de proliferação como ferramenta prognóstica.

## **2.8 FATORES PROGNÓSTICO NO LINFOMA FOLICULAR**

O Linfoma folicular tem evolução heterogêna, com alguns pacientes seguindo curso indolente durante anos, enquanto outros evoluem rapidamente com grandes massas linfonodais, visceromegalias e necessidade de tratamento (HORNING e ROSENBERG 1984; CASULO et al. 2015).

Novas estratégias terapêuticas para o tratamento do Linfoma Folicular (LF) foram desenvolvidas ao longo dos anos. Dentre elas, podemos destacar a combinação de quimioterapia e interferon alfa, o uso de anticorpos monoclonais, como o anti-CD20 de maneira isolada ou ligada a um radio nuclideo, o transplante de células-tronco autólogas ou células-tronco alógenicas (MCLAUGHLIN et al. 1998; SOLAL-CÉLIGNY et al. 1998; KHOURI et al. 2001; DILLMAN 2002; HUNAUULT-BERGER et al. 2009; MARCUS et al. 2017).

Apesar desses tratamentos terem demonstrado uma boa atividade

em ensaios clínicos, estas novas terapias apresentam toxicidade significativa, além de terem um alto custo. Assim, um índice prognóstico mais adequado à essas novas terapias seria uma ferramenta valiosa para auxiliar na definição de risco e traçar estratégia individualizada para cada paciente (SOLAL-CÉLIGNY et al. 2004; SEHN et al. 2007).

Vários índices prognósticos tem sido estudado, com objetivos de identificar pacientes com doença mais agressiva e resposta curta ao tratamento. Os mais estudados e utilizados são o grau histológico e o que utiliza parâmetros clínicos e laboratoriais de fácil aplicação: FLIPI (abreviatura em inglês de Follicular Lymphoma Internacional Prognostic index). A primeira versão deste índice foi publicada em 2004 e a segunda versão (FLIPI2) em 2009 (SOLAL-CÉLIGNY et al. 2004; FEDERICO et al. 2009; HARRIS et al. 1999).

O FLIPI leva em consideração alguns parâmetros: idade superior a 60 anos; estadio III e IV; anemia com hemoglobina (hb) <120g/l; número de áreas nodais envolvidas maior que 4 e desidrogenase láctica (DHL) maior que o limite superior da normalidade. O FLIPI2 utiliza os seguintes parâmetros: idade superior a 60 anos; envolvimento de medula óssea; anemia com hb<120g/l; linfonodos envolvidos com mais de 6cm e beta-2-microglobulina maior que o limite superior da normalidade. Assim, os pacientes são classificados de acordo com o risco e conseqüentemente probabilidade de sobrevida em 10 anos: baixo risco tem até um parâmetro (Sobrevida Global (SG) = 70,7%); risco intermediário tem até 2 parâmetros (SG=50,4%) e alto risco com 3 ou mais parâmetros (SG=35,5%) (SOLAL-

CÉLIGNY et al. 2004; FEDERICO et al. 2009). O FLIPI é usado atualmente para definir o risco individual de morte e o grau de tumor (CHAU et al. 2003; SWENSON et al. 2005; VAN DE SCHANS et al. 2009; RELANDER et al. 2010). O FLIPI 2 foi desenvolvido como um novo modelo para a definição prognóstica de pacientes com LF (SWENSON et al. 2005). Ele se encaixa melhor na realidade atual do problema, já que foi desenvolvido com pacientes tratados com imunoterapia e discrimina em grupos de acordo com um intervalo livre de progressão da doença, que é uma variável mais apropriada e precisa para LF (FEDERICO et al. 2009; BAI e HUANG 2015; PROVENCIO et al. 2017).

No entanto, o FLIPI foi construído antes da era dos anticorpos monoclonais e o estudo coorte inicial não representa o curso atual da doença. Além disso, o FLIPI está baseado na análise retrospectiva de dados arquivados e os resultados são limitados pela seleção de pacientes, dados faltantes e nenhuma inclusão de parâmetros mais recentemente relatados. Finalmente, embora a sobrevida global (SG) seja o ponto final ideal, a criação de um índice com esse ponto final não é realista nos casos de Linfoma Folicular, enquanto que a sobrevida livre de progressão (SLP) é um substituto adequado (FEDERICO et al. 2009).

Estes parâmetros ainda apresentam limitações na predição da evolução do paciente, da indicação de tratamento e reforça a necessidade de pesquisas para validar novos parâmetros biológicos que possam aumentar a precisão do prognóstico. Portanto, faz-se necessário e urgente identificar mais biomarcadores para estratificar com precisão o grupo de

pacientes com resultados mais desfavoráveis e assim formular os regimes de tratamento individuais (HE et al. 2014; PROVENCIO et al. 2017).

Vários outros preditores de risco tem sido avaliados, porém de difícil utilização clínica como: estudo de genes; mudanças no microambiente tumoral do LF; modificações nas histonas (DAVE et al. 2004; FARINHA et al. 2005; GLAS et al. 2005; SMITH et al. 2013).

O m7-FLIPI, que utiliza o estado mutacional de sete genes, associado ao FLIPI e performace estado ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) foi criando usando tecnologia mais atual, buscando identificar grupo de pior prognóstico no LF. Quando incorporado na prática na clínica, poderá extratificar melhor os pacientes com LF ( PASTORE et al. 2015; JURINOVIC et al. 2016)

O imunofenótipo das células neoplásicas tem sido motivo de investigação. O Índice de Proliferação mostrou valor prognóstico no LF por alguns autores (MARTIN et al. 1995; HALL et al. 1988; SWERDLOW et al. 1993). Outros marcadores não tem mostrado resultados prognósticos consistentes, como a família de proteínas BCL2 (LOGSDON et al. 1999). Dentre os marcadores do centro germinativo, o PU-1 mostrou um ter relação com sobrevida, o que não ocorre com o marcador de membrana CD10 e o BCL6 (TORLAKOVIC et al. 2006).

No que se refere a proliferação celular, alguns marcadores tem sido foco de estudos que visam validá-los como ferramentas para aprimorar o prognóstico de Linfomas, incluindo-se o Folicular, dos quais descatam-se a Top-2a e o Ki-67 (HALL et al. 1988; BRYANT et al. 2006; KALPADAKIS et

al. 2007; DETERMANN et al. 2008; BROYDE et al. 2009; KLAPPER et al. 2009; NAZ et al. 2011; DHALL et al. 2012; HASHMI et al. 2014; HE et al. 2014; PAYANDEH et al. 2015; BERLIN et al. 2017; CIEPLIŃSKI et al. 2018).

A mutação da p53 ao diagnóstico foi associada com uma sobrevida inferior (O'SHEA et al. 2008).

Superexpressão da SOCS3, citocina supressora que inibe a citocina sinalizadora da Janus quinase (via JAK-STAT), foi associada como um fator prognóstico desfavorável no LF (KRISHNADASAN et al. 2006).

Diante da complexidade das alterações metabólicas e moleculares que ocorrem nas neoplasias, torna-se fundamental compreender a ação e a modulação desses marcadores de proliferação celular para que estes possam ser seguramente incluídos como variável nos prognósticos de linfomas.

### 3 JUSTIFICATIVA

A Top-2A tem sido estudada em diversos tumores e sua expressão tem correlação com a diminuição da sobrevida livre de doença e com o Ki-67, porém não há estudos com LF (RODY et al. 2009; YAN et al. 2015). Assim, devido a falta de dados na literatura e na busca de novos marcadores prognósticos decidimos estudar o papel prognóstico da Top-2A no LF.

A relação entre a expressão de Ki-67 com alguns subtipos de linfoma ainda é contraditória. Alguns estudos correlacionam uma alta expressão de Ki-67 a uma menor sobrevida, outros apresentaram uma correlação inversa e houve estudos que não conseguiram observar relação entre a Ki-67 e sobrevida (JERKEMAN et al. 2004; LI et al. 2013; HE et al. 2014). Decidimos estudar a relação do Ki67 com prognóstico de LF devido aos dados controversos na literatura, facilidade de uso e sua associação positiva em várias neoplasias.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar o valor prognóstico da imunoexpressão de marcadores de proliferação celular: Ki-67 e Top-2a.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Correlacionar Ki-67 e Top2a com as variáveis clínicas e histológicas;
- 2 Estabelecer as relações de probabilidade de sobrevida entre as variáveis.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 AMOSTRA**

Foram estudados 170 casos diagnosticados como LF, sendo 100 mulheres e 70 homens com média de idade de 56,1 anos, do Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center, do ano de 2004 à 2015 de acordo a a classificação da WHO (CAMPO et al. 2011).

Os sujeitos desta pesquisa tiveram os dados de evolução clínica e laboratorial analisados, e disponibilidade de tecido tumoral arquivado em blocos de parafina. Foram excluídos pacientes com linfoma agressivo concomitante ao diagnóstico, indivíduos com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e doença cutânea localizada. Somente foram incluídos pacientes que receberam tratamento com rituximabe.

O presente projeto, 2531/18, foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição. Os dados clínicos e laboratoriais necessários foram coletados dos prontuários dos pacientes. Nenhuma nova intervenção foi necessária para este estudo (novas coletas de líquidos ou tecidos), e apenas o pesquisador principal teve informação sobre a identidade dos pacientes para proceder à adequada coleta dos dados e tecidos.

## 5.2 HISTOLOGIA

As amostras de tecido tumoral incluídas em parafina e em lâminas histológicas, foram recuperadas dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da Instituição e reavaliadas histologicamente, coloridas com Eosina e Hematoxilina. Avaliou-se o grau histológico, segundo os critérios da OMS de 2008. Duas áreas de 1mm de diâmetro incluindo tumor foram selecionadas para construção de um microarranjo de tecidos (TMA, do inglês, *tissue microarray*) e colocado com os anticorpos destacados abaixo para análise de imunohistoquímica. Desta forma, o restante do tecido ficou íntegro, sem prejuízo para futuras demandas pelo paciente ou responsável.

## 5.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

Cortes do TMA foram submetidos a estudo imunohistoquímico, com preparo da amostra, recuperação antigênica, desparafinização e preparo com anticorpos para marcadores de proliferação celular, Ki-67 da fabricante Dako, e Top-2 da fabricante Leica.

As lâminas foram mergulhadas em tampão de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)/TRIS, levadas em banho-maria, à temperatura de 97,5°C por 40 minutos. Após resfriarem em temperatura ambiente por 20 minutos, as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas em solução tampão salina de fosfato (PBS) com TWIN 20 (Sigma código P7949), sendo realizados três banhos de cinco minutos cada. Em

seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos previamente diluídos em uma solução de PBS-TWIN20+BSA a 0,1%.

Nas lâminas de TMA foram avaliadas os marcadores de maneira quantitativa [número de células positivas por  $\mu\text{m}^2$ ], realizada através das imagens por microscopia e capturadas por câmera de 20x dos preparados imunohistoquímicos no aparelho Aperio Scanscope®, sediado no A.C.Camargo Cancer Center.

Cada lâmina de TMA foi mapeada e programada para análise pelo algoritmo "Positive Pixel Count (v.9)", utilizando o sistema *TMA Lab*. Áreas de fibrose ou necrose foram eliminadas utilizando o sistema "pen tool". O algoritmo mencionado classifica os pixels, em cada *spot* de TMA, como "0" (negativo), "1" (positivo fraco), "2" (positivo médio) e "3" (positivo forte). Estes dados foram processados como se segue:

Marcadores do núcleo de populações específicas do microambiente celular como Top2a e ki67, eram realizados um escore de cada caso e calculado dividindo-se o número de pixels de qualquer positividade pelo número total de pixels (fração de positividade), conforme a formula:  $=3(n. \text{Positivo forte}/n. \text{Pixel total}) \times 100 + 2(n. \text{Positivo moderado}/n. \text{Pixel total}) \times 100 + 1(n. \text{Positivo fraco}/n. \text{Pixel total}) \times 100$ . O resultado será entre 1 e 300.

Os dados obtidos pela quantificação imunohistoquímica dos marcadores de proliferação celular foram relacionados com o grau histológico atribuído classicamente, com o FLIPI, a sobrevida global,

sobrevida livre de doença e o risco de transformação para linfoma agressivo. Esta relação foi estudada de modo bivariada e multivariada, com o objetivo de verificar se algum dos marcadores de proliferação, associado ou não a outros clássicos, apresentam valor independente de prognóstico.

#### **5.4 DADOS CLÍNICOS**

Os dados clínicos relevantes foram coletados nos prontuários do paciente, incluindo: idade no diagnóstico, sexo, estadiamento de Ann Arbor, presença de sintomas B, presença de doença volumétrica (> 6cm), presença de doença extranodal (excluindo medula óssea), presença de Infiltração da medula óssea no diagnóstico, regime terapêutico de primeira linha e utilização de manutenção com imunobiológicos.

Além disso, a data do diagnóstico, a data da primeira recaída (quando disponível) e a data do último acompanhamento foram calculadas adicionalmente. A resposta ao tratamento foi avaliada com PET e quando não disponível por tomografia computadorizada. Também avaliamos os escores prognósticos para LF, o FLIPI.

A resposta a terapia inicial foi coletada de casos tratados com o esquema R-CVP ( rituximab, ciclofosfamida e vincristina) e R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona). A resposta foi classificada de acordo com o critério do Internacional Working Group Criteria: completa, resposta parcial, doença progressiva e doença primariamente refratária ( CHESON et al. 2000)

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas por meio do software Stata Statistical Software® 12.0 (College Station, Texas, Estados Unidos), sendo as variáveis categóricas distribuídas em percentuais e as variáveis contínuas sumarizadas por meio de mediana e intervalo interquartil (IQR) ou por médias e intervalos de confiança a 95%, de acordo com o resultado do teste de Shapiro-Wilk para normalidade das distribuições.

As variáveis numéricas foram analisadas pelo teste t de *student* não pareado ou seu análogo não paramétrico teste de Mann-Whitney para avaliar a diferença estatística entre dois grupos e a ANOVA para verificar a diferença estatística em variáveis com dois ou mais grupos, ou seu análogo não paramétrico Kruskal-Wallis. Foi realizado também a correlação de Spearman para determinação de coeficiente de correlação destas variáveis.

A análise múltipla foi conduzida pela regressão de Cox utilizando o método de retirada progressiva das variáveis (*stepwise backward*) passo a passo, com base em um conjunto inicial de variáveis composto por aquelas com valor  $p < 0,20$  na análise bivariada ou quando possuíam plausibilidade biológica.

A probabilidade de sobrevida foi calculada utilizando o tempo decorrido entre o diagnóstico de linfoma folicular e a data do óbito, considerando este desfecho como falha e sua não ocorrência como censura. O tempo livre de progressão foi calculado utilizando o tempo decorrido entre o diagnóstico de linfoma folicular e a data da progressão tumoral,

considerando este desfecho como falha e sua não ocorrência como censura.

Utilizou-se a curva de Kaplan-Meier para representação gráfica das funções de sobrevida que foram analisadas pelo teste bivariado de Log-rank, considerando significativo estatisticamente o valor de  $p \leq 0,05$  bicaudal.

## 6 RESULTADOS

Foram avaliados 170 pacientes, a média da idade dos pacientes do sexo masculino foi igual a 55,6 anos (Min=21; Max=79) (IC95%=52,5-58,7) e dos pacientes do sexo feminino igual a 56,4 anos (Min=19; Max=91) (IC95%=53,9-58,9), sem diferença estatística. A distribuição percentual das variáveis clínicas e patológicas foi discriminada na Tabela 2.

**Tabela 2** - Características clínicas e patológicas de pacientes com linfoma folicular

Variáveis	n	%
Idade em anos (média, IC95%)	56,1	(54,1 - 58,0)
Sexo		
Masculino	70	41,2
Feminino	100	58,8
Sintomas B		
Presente	58	34,1
Ausente	109	64,1
Indisponível	3	1,8
Bulky		
Presente	43	25,3
Ausente	115	67,6
Indisponível	12	7,1
Extranodal		
Sim	58	34,1
Não	103	60,6
Indisponível	9	5,3
Estadiamento		
1	12	7,1
2	16	9,4
3	50	29,4
4	92	54,1

**Cont/Tabela 2**

Variáveis	n	%
Medula óssea envolvida no diagnóstico		
Sim	74	55,3
Não	94	43,5
Indisponível	2	1,2
FLIPI		
Baixo risco	35	20,6
Médio risco	70	41,2
Alto risco	52	30,6
Indisponível	13	7,6
Ki-67 (mediana, IQR)	2,39	(0,86 – 5,70)
Top-2a (mediana, IQR)	84,64	(40,46 – 145,12)
Óbito		
Sim	28	16,5
Não	142	83,5
Progressão do tumor		
Sim	63	37,1
Não	107	62,9
Resposta à quimioterapia		
Completa	123	72,4
Parcial	27	15,9
Progressão	8	4,7
Refratário	4	2,3
Indisponível	8	4,7
Manutenção posterior com imunobiológicos		
Sim	94	55,3
Não	70	41,2
Indisponível	6	3,5

IC95%: intervalo de confiança a 95%; IQR: intervalo interquartil.

Os pacientes cuja resposta à quimioterapia foi a progressão da doença (8/170) apresentaram mediana do marcador de proliferação celular Ki-67 = 7,79 (IQR= 4,94 - 14,89) maior que os pacientes que não apresentaram progressão de 2,39 (IQR = 0,91 - 5,71), sendo  $p=0,035$ . O mesmo comportamento também foi observado para o marcador de proliferação celular Top-2a, cujas medianas entre os pacientes que houve progressão de 194,37 (IQR = 156,59 - 227,59) em resposta à quimioterapia

foram estatisticamente diferentes ( $p=0,018$ ) e maiores que entre os pacientes sem progressão como resposta à quimioterapia de 81,15 (IQR = 39,47 - 141,35), como pode ser observado na Tabela 3 abaixo.

**Tabela 3** - Comparação estatística das medianas e respectivos intervalos interquartis dos marcadores de proliferação celular em pacientes com linfoma folicular.

Marcadores de proliferação celular	Resposta à quimioterapia		p
	Progressão (n=8)	Outras (n=154)	
Ki-67	7,79 (4,94-14,89)	2,39 (0,91-5,71)	0,035
Top-2 <sup>a</sup>	194,37 (156,59-227,59)	81,15 (39,47-141,35)	0,018

Quanto maior os valores do marcador de proliferação celular Ki-67 menor foi o tempo livre da progressão (TLP) tumoral após o início da quimioterapia ( $\rho = -0,28$ ;  $p < 0,01$ ). As correlações realizadas neste estudo podem ser observadas na Tabela 4 abaixo.

**Tabela 4** - Matriz de correlação das variáveis avaliadas em pacientes com linfoma folicular.

Variáveis	Ki-67	Top-2a	Estadio	Idade	Flipi	TLP
Ki-67	1,00					
Top-2 <sup>a</sup>	0,22*	1,00				
Estadio	0,06	0,11	1,00			
Idade	0,23*	0,09	-0,11	1,00		
FLIPI	0,21	-0,02	0,40*	0,32*	1,00	
TLP	-0,28*	0,20	0,01	-0,33*	-0,21	1,00

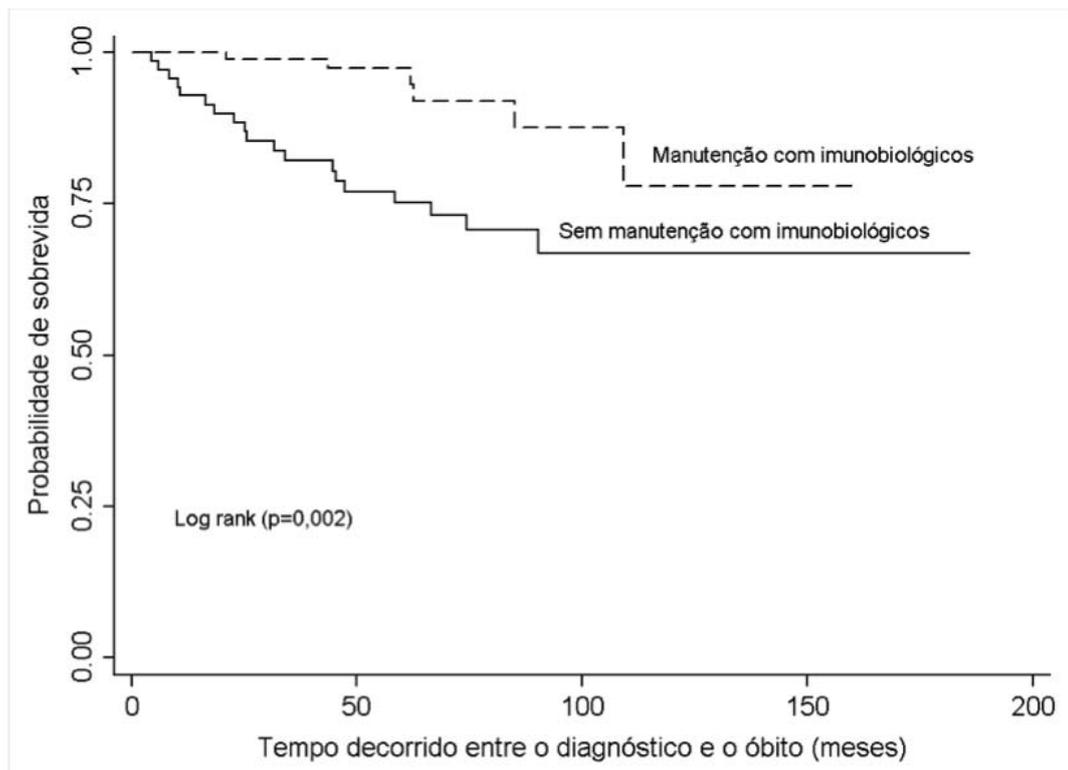
TLP: tempo livre de progressão após início da quimioterapia (meses); \* $p < 0,05$

A Tabela 5 a seguir apresenta o risco relativo para ocorrência do óbito enquanto a tabela 6 apresenta o risco relativo para a progressão da doença em pacientes com linfoma folicular, e em ambos os casos segundo a presença das variáveis clínicas e patológicas.

Após 5 anos do diagnóstico a probabilidade de sobrevida entre os pacientes com linfoma folicular foi igual a 86,8% (IC95% = 80,2 - 91,3). Os pacientes idosos obtiveram índice de 74,3% (IC95% = 59,8 - 84,2). Sendo assim, os idosos apresentaram probabilidade de sobrevida 18,4% menor que os pacientes não idosos (92,7%; IC95% = 85,2 - 96,5), após 5 anos do diagnóstico, com diferença estatística ( $p=0,0002$ ).

A probabilidade de sobrevida entre pacientes com presença de sintomas B (67,1%; IC95% = 52,2 - 78,3) foi estatisticamente menor (28,4%;  $p<0,01$ ) que a probabilidade de sobrevida em pacientes sem a presença de sintomas B (95,5%; IC95% = 88,1- 98,3), após 5 anos do diagnóstico.

Os pacientes que realizaram manutenção com imunobiológicos (97,4%; IC95% = 90,0 - 99,4) apresentaram probabilidade de sobrevida global 22,2% ( $p=0,002$ ) maior após 5 anos do diagnóstico que os pacientes que não fizeram (75,2%; IC95% = 62,5 - 84,1). Estes dados podem ser observados na Tabela 5 abaixo e na curva de sobrevida da Figura 5.



**Figura 5** - Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevida em pacientes com linfoma folicular segundo o uso de manutenção com imunobiológicos.

**Tabela 5** - Risco relativo para ocorrência de óbito em pacientes com linfoma folicular segundo a presença das variáveis clínicas e patológicas.

Variáveis	Bivariada			Múltipla		
	RR	IC95%	p	RR	IC95%	P
<b>Idade</b>						
≥ 60 anos	4,08	1,76 – 10,25	<0,01	44,85	6,25 – 321,88	<0,01
< 60 anos	1,00			1,00		
<b>Sexo</b>						
Masculino	1,98	0,88 – 4,59	0,07	21,57	3,39 – 136,97	<0,01
Feminino	1,00			1,00		
<b>Sintomas B</b>						
Presente	5,89	2,48 – 5,46	<0,01	16,23	2,38 – 110,96	<0,01
Ausente	1,00			1,00		
<b>Bulky</b>						
Presente	2,72	1,12 – 6,44	0,02	1,17	0,26 – 5,37	0,83
Ausente	1,00			1,00		
<b>Extranodal</b>						
Sim	2,62	1,08 – 6,58	0,02	1,14	0,28 – 4,57	0,85
Não	1,00			1,00		
<b>Estadiamento</b>						
1	1,00			1,00		
2	1,01	0,07 – 13,95	0,99	7,88	0,26 – 241,78	0,24
3	0,63	0,10 – 6,67	0,58	0,33	0,01 – 19,59	0,59
4	1,34	0,32 – 11,89	0,75	0,16	0,01 – 18,38	0,45
<b>Medula óssea envolvida no diagnóstico</b>						
Sim	2,15	0,93 – 5,24	0,054	7,72	0,41 – 145,02	0,17
Não	1,00			1,00		
<b>FLIPI</b>						
Baixo risco	1,00			1,00		
Médio risco	1,46	0,24 – 15,30	0,69	0,88	0,03 – 24,01	0,94
Alto risco	8,62	2,08 – 76,35	<0,01	1,60	0,05 – 52,17	0,79
<b>Progressão do tumor</b>						
Sim	-	-	-	-	-	-
Não						
<b>Resposta à quimioterapia</b>						
Completa	1,00			1,00		
Parcial	2,93	0,79 – 9,42	0,07	1,68	0,27 – 10,25	0,58
Progressão	51,45	16,62 – 149,73	<0,01	410,01	24,74 – 6793,95	<0,01
Refratário	37,88	6,69 – 147,10	<0,01	4,81	0,36 – 64,28	0,23
<b>Manutenção posterior com imunobiológicos</b>						
Sim	0,26	0,08 – 0,67	<0,01	0,36	0,78 – 1,72	0,20
Não	1,00			1,00		

FLIPI: *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*; RR: risco relativo; IC95%: intervalo de confiança a 95%.

Na Tabela 5 pode-se observar que na regressão de Cox (análise múltipla), os pacientes idosos e do sexo masculino com linfoma folicular apresentaram risco elevado para o óbito quando comparado com pacientes não idosos e do sexo feminino, respectivamente. Na análise múltipla pela regressão de Cox, a idade maior igual a 60 anos aumentou o risco de progressão em 2 vezes em pacientes com linfoma folicular quando comparados com pacientes com idade inferior a 60 anos (Tabela 6).

A presença de sintomas B aumentou o risco de óbito em 16 vezes em pacientes com linfoma folicular, quando comparado com pacientes com este tipo de linfoma, mas sem a presença de sintomas B. Os pacientes que apresentaram como resposta à quimioterapia a progressão do tumor tiveram risco significativamente elevado para o óbito.

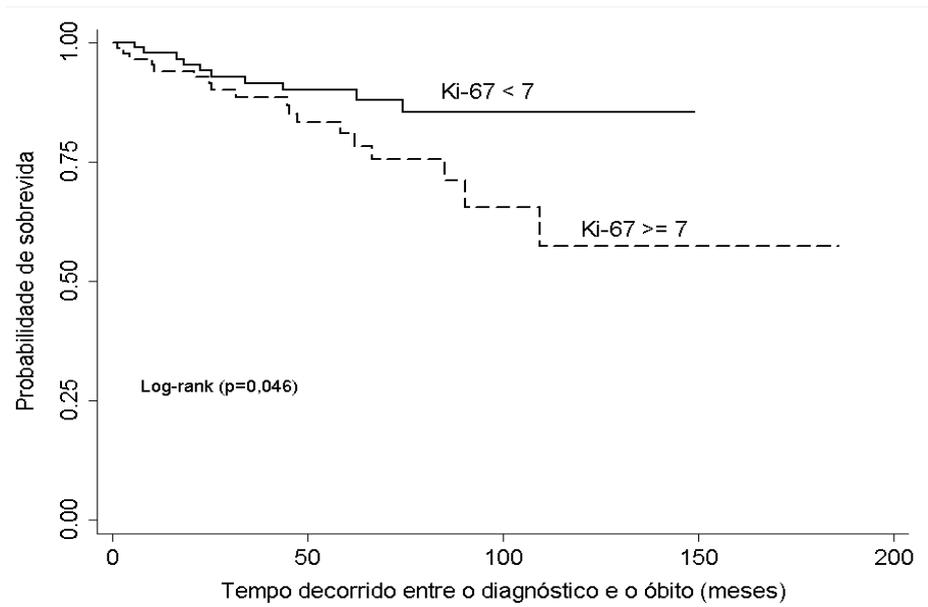
**Tabela 6** - Risco relativo para ocorrência de progressão tumoral em pacientes com linfoma folicular segundo a presença das variáveis clínicas e patológicas.

Variáveis	Bivariada			Múltipla		
	RR	IC95%	p	RR	IC95%	P
<b>Idade</b>						
≥ 60 anos	1,55	0,91 – 2,61	0,09	2,32	1,14 – 4,72	0,02
< 60 anos	1,00			1,00		
<b>Sexo</b>						
Masculino	1,45	0,85 – 2,45	0,14	1,73	0,90 – 3,34	0,10
Feminino	1,00			1,00		
<b>Sintomas B</b>						
Presente	2,71	1,59 – 4,63	<0,01	2,97	1,50 – 5,88	<0,01
Ausente	1,00			1,00		
<b>Bulky</b>						
Presente	0,91	0,45 – 1,72	0,79	0,65	0,29 – 1,44	0,29
Ausente	1,00			1,00		
<b>Extranodal</b>						
Sim	1,80	1,04 – 3,12	0,03	1,24	0,58 - 2,62	0,57
Não	1,00			1,00		
<b>Estadiamento</b>						
1	1,00			1,00		
2	0,59	0,09 – 2,86	0,45	0,37	0,03 – 4,08	0,42
3	0,63	0,21 – 2,25	0,38	0,64	0,13 – 3,29	0,60
4	1,20	0,47 – 3,88	0,74	0,81	0,13 – 5,22	0,83
<b>Medula óssea envolvida no diagnóstico</b>						
Sim	1,72	1,01 – 2,96	0,03	1,14	0,36 – 3,65	0,82
Não	1,00			1,00		
<b>FLIPI</b>						
Baixo risco	1,00			1,00		
Médio risco	1,39	0,64 – 3,27	0,39	1,06	0,38 – 2,95	0,91
Alto risco	2,44	1,13 – 5,69	0,02	0,79	0,25 – 2,55	0,70
<b>Resposta à quimioterapia</b>						
Completa	1,00			1,00		
Parcial	2,65	1,28 – 5,17	<0,01	4,26	1,78 – 10,17	<0,01
Progressão	31,16	12,43 – 68,81	<0,01	63,85	13,76 – 296,36	<0,01
Refratário	20,18	5,19 – 56,76	<0,01	19,27	4,14 – 89,78	<0,01
<b>Manutenção posterior com imunobiológicos</b>						
Sim	0,64	0,37 – 1,11	0,09	0,97	0,46 – 2,06	0,94
Não	1,00			1,00		

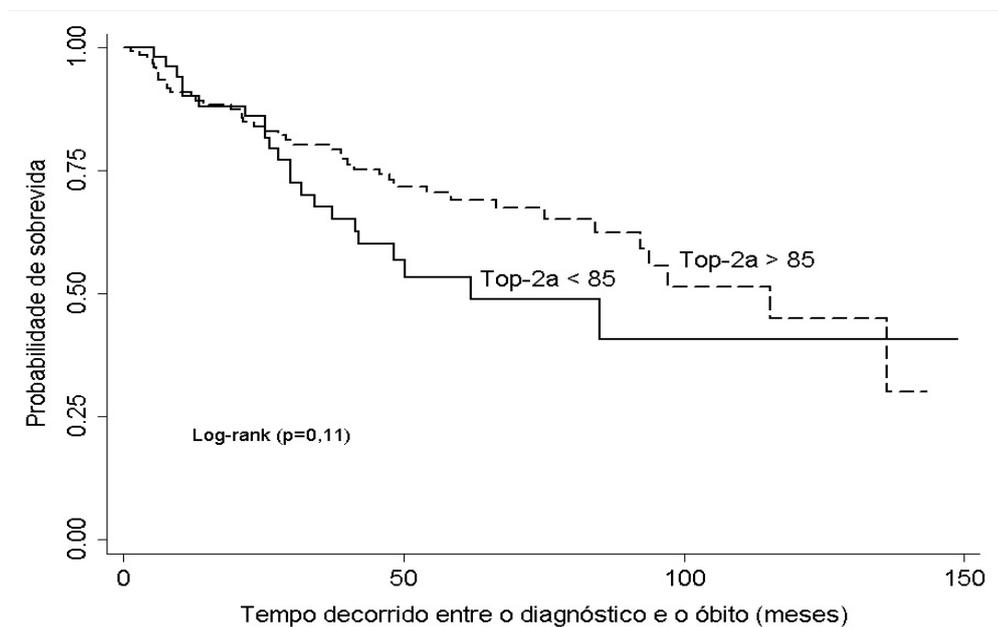
FLIPI: *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*; RR: risco relativo; IC95%: intervalo de confiança a 95%.

Após 5 anos do diagnóstico, a probabilidade de não ocorrer progressão nos pacientes com linfoma folicular foi igual a 64,5% (IC95%=56,0-71,8). Oito anos após o diagnóstico de linfoma folicular foi o tempo em que metade dos pacientes (probabilidade mediana) apresentaram progressão tumoral.

Após cinco anos do diagnóstico de linfoma folicular, a probabilidade de sobrevida entre pacientes que apresentaram  $Ki-67 < 7$  foi igual a 90,0% (IC95%=81,0-95,0), enquanto que os que apresentaram  $Ki-67 \geq 7$  a probabilidade de sobrevida foi igual a 81,0% (IC95%=68,9-88,7), como pode ser observado na figura 6. Sendo assim, os pacientes com linfoma folicular que apresentaram  $Ki-67 \geq 7$  tiveram uma probabilidade de sobrevida 9% inferior aos pacientes com a mesma condição patológica, mas que os valores do Ki-67 foram inferiores a 7. Esse comportamento não foi observado para o marcador Top-2a, não encontrando diferença estatística entre os pontos de corte como pode ser observado na Figura 7.

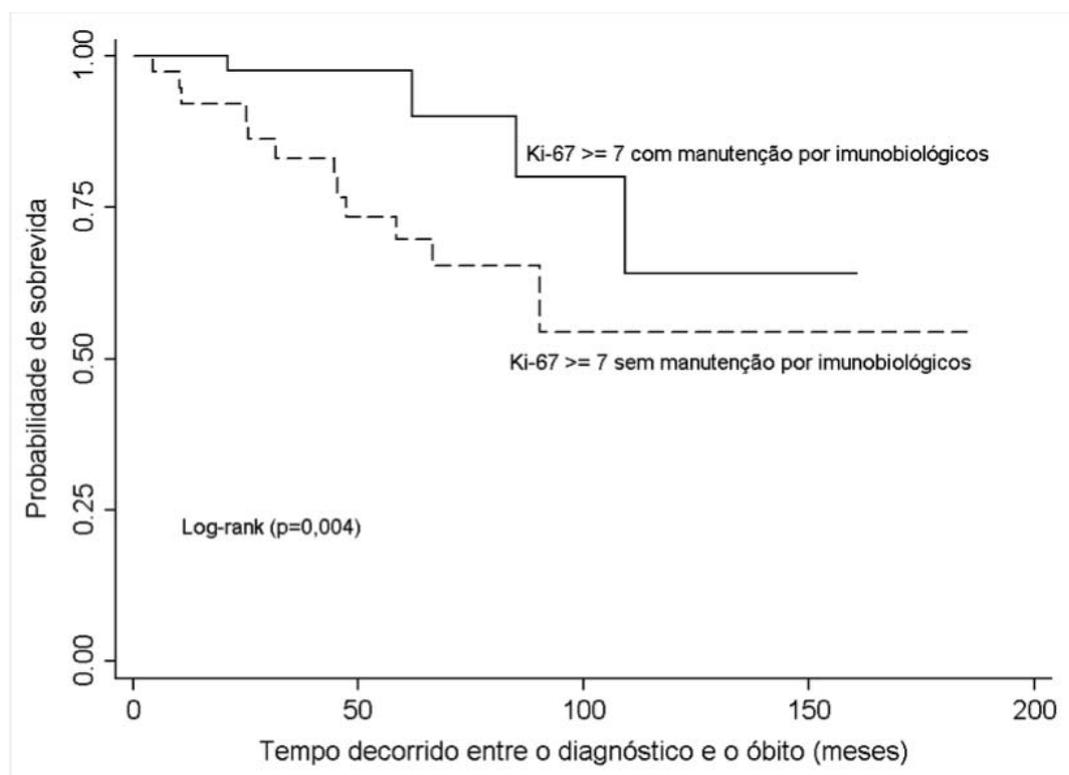


**Figura 6** - Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevida em pacientes com linfoma folicular segundo a presença do marcador de proliferação celular Ki-67.



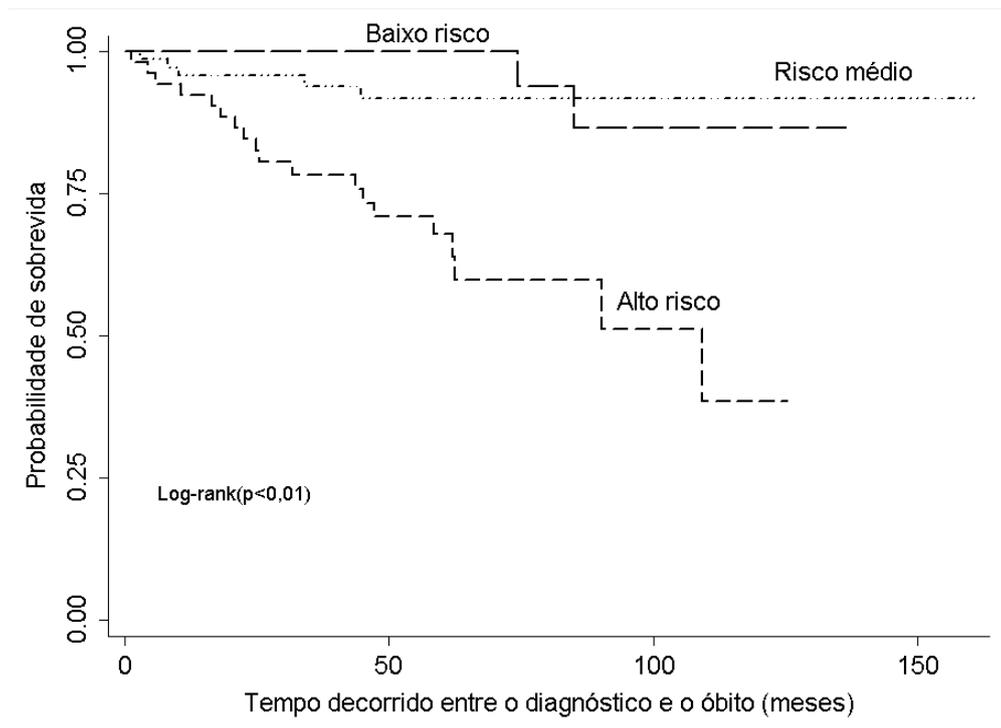
**Figura 7** - Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevida em pacientes com linfoma folicular segundo a presença do marcador de proliferação celular Top-2a.

Os pacientes que com  $Ki67 \geq 7$  que fizeram manutenção com imunobiológicos também tiveram sobrevida maior comparado aos que não fizeram ( $p=0,04$ ), como pode ser observado na figura 8. A probabilidade de sobrevida após 5 anos do diagnóstico foi igual a 69,8% (IC95%, 50,7-82,6) entre os pacientes com  $Ki67 \geq 7$  sem manutenção e igual a 97,6% (IC95%, 84,1-99,6) entre os pacientes com  $Ki67 \geq 7$  com manutenção.



**Figura 8** - Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevida em pacientes com linfoma folicular com  $Ki67 \geq 7$  segundo a utilização de manutenção com imunobiológicos.

Após 5 anos de diagnóstico, os pacientes classificados com FLIPI de alto risco (50,5%; IC95%=34,7-64,3) apresentaram probabilidade de permanecer sem progressão quase 20% ( $p=0,03$ ) menor que os pacientes classificados com FLIPI de médio risco (70,0%; IC95%=56,9-79,8).



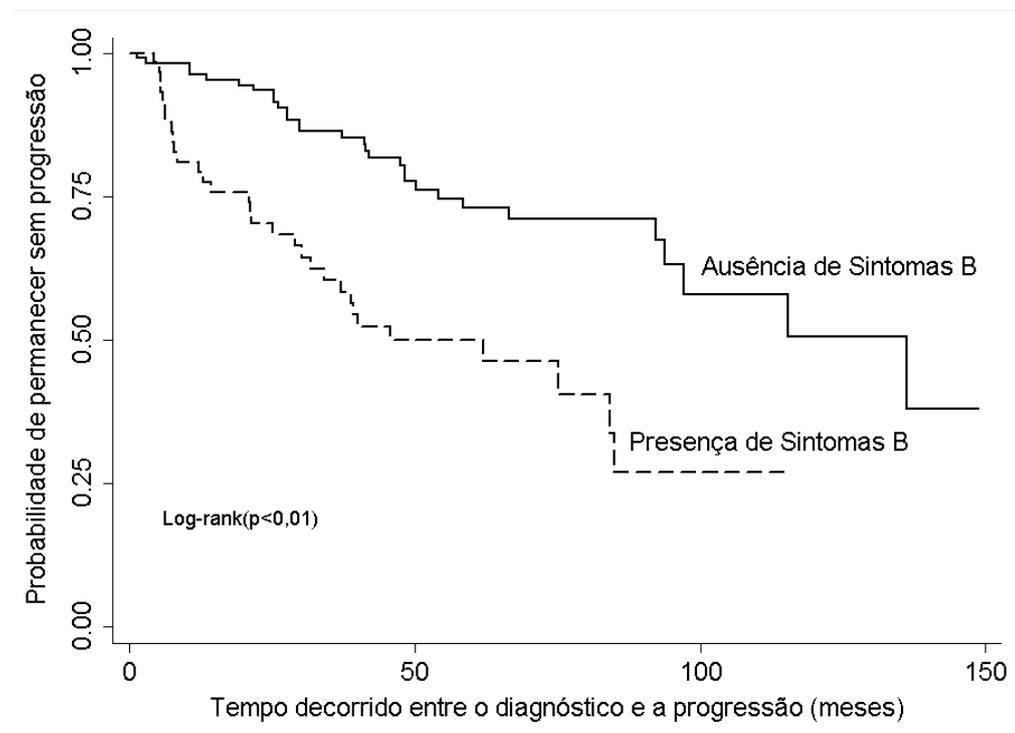
**Figura 9** - Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de sobrevivência em pacientes com linfoma folicular segundo a classificação do FLIPI.

A probabilidade mediana de sobrevivência (tempo em que metade das pessoas acompanhadas evoluiu ao óbito) em pacientes com linfoma folicular classificados com FLIPI de alto risco ocorreu após 8 anos do diagnóstico, como pode ser observado na Figura 9.

O tempo necessário para que metade dos pacientes seguidos apresentasse a progressão tumoral foi quase 6 anos menor entre aqueles que apresentaram sintomas B (3,8 anos) quando comparados com os que não apresentaram (9,6 anos).

A presença de sintomas B em pacientes com linfoma folicular triplicou o risco de progressão tumoral quando comparado com pacientes sem a presença de sintomas B (Figura 10). Em relação à resposta à quimioterapia, os pacientes com linfoma folicular que apresentaram o tipo parcial tiveram

um risco 78% maior de progressão do que os pacientes que apresentaram resposta completa.



**Figura 10** - Curva de Kaplan-Meier com a probabilidade de permanecer sem progressão segundo a presença de sintomas B.

## 7 DISCUSSÃO

Em pacientes com LF após cinco anos do diagnóstico, a probabilidade de sobrevida entre os que apresentaram  $Ki-67 < 7$  foi significativamente superior aos que apresentaram  $Ki-67 \geq 7$ . Isto representa uma probabilidade de sobrevida 9% inferior para os pacientes que apresentaram  $Ki-67 \geq 7$ . Um valor maior do marcador de proliferação celular  $Ki-67$  foi também associado com um menor tempo livre da progressão (TLP) tumoral após o início da quimioterapia. Esse comportamento e relação não foi observado para o marcador Top-2a, não encontrando diferença estatística entre os pontos de corte. Estes resultados com relação a Top2a foram semelhantes ao observado em estudo com câncer de mama (ZOLA 2009). Em outro estudo, observaram uma associação significativa de IP  $Ki-67 > 45\%$  em relação aos sintomas de B e ao local de envolvimento, em termos de origem extranodal, para o linfoma não Hodgkin. Essas correlações demonstram o papel significativo do alto valor de  $Ki-67$  IP, para estabelecer a atividade proliferativa do tumor como marcador de índice de prognóstico juntamente com parâmetros clínicos no momento do diagnóstico (ARISAWA et al. 1999; NAZ et al. 2011; KEDMI et al. 2014).

Uma correlação altamente significativa entre a proporção de células positivas para  $Ki-67$  e a classificação em LNH maligno de alta e baixa agressividade já foi demonstrada previamente. Além disso, também foi observado a existência de uma correlação positiva entre o prognóstico e as taxas de proliferação em distúrbios linfoproliferativos de células B e T

crônicas (MELO et al. 1992; HOSTER et al. 2008). Assim, o Ki-67 parece fornecer informações precoces e precisas sobre o valor prognóstico em conjunto com os dados clínicos (BROWN e GATTER 1990; NAZ et al. 2011).

No entanto, os resultados sobre a relação entre a expressão de Ki-67 e alguns subtipos de linfoma ainda são contraditórios e pouco conclusivos. Um grupo de estudos demonstraram que uma alta expressão de Ki-67 se correlaciona com taxas de sobrevida menores, outros estudos não observaram essa associação ou observaram resultados inversos (JERKEMAN et al. 2004; LI et al. 2013; HE et al. 2014). Nosso resultados no presente estudo, apoiam o papel deste marcador como valor prognóstico, uma vez que foi observado que após cinco anos do diagnóstico de linfoma folicular, a probabilidade de sobrevida foi maior entre pacientes que apresentaram os menores valores de Ki-67.

Em nosso trabalho, os pacientes que tiveram progressão da doença em resposta a quimioterapia apresentaram um marcador de proliferação celular Ki-67 significativamente maior que os que não apresentaram progressão. O mesmo comportamento também foi observado para o marcador de proliferação celular Top-2a (valores de mediana maiores em pacientes que tiveram progressão em resposta à quimioterapia). Este achado é importante pois permite diferenciar um subgrupo de prognóstico ruim, e eleger estes marcadores como fatores prognósticos (DINGEMANS et al. 1998; PROVENCIO et al. 2003). Apesar do presente estudo não ter avaliado a expressão da p53, uma maior presença da Top-2a esta de acordo com a noção de que em quadros neoplásicos ocorre a inativação da proteína p53, o que permite a proliferação celular sendo observado uma

superexpressão da Top-2a (ZOLA 2009). O IP Ki-67 mais elevado está associado a um mau prognóstico, tanto em malignidades sólidas como hematológicas (HALL et al. 1988; NAZ et al. 2011). Assim, o Ki-67 tem sido considerado um excelente marcador para determinar a fração de crescimento de uma determinada população de células (ZEGGAI et al. 2016).

No presente estudo, a Top-2a apresentou baixa correlação positiva com a Ki-67 nas amostras de pacientes com LF, somente sendo concordante nos pacientes que apresentaram progressão da doença como resposta a quimioterapia. Entretanto a correlação entre a Top-2a e o Ki-67 para diferentes tipos de linfomas, ainda apresentam resultados contraditórios na literatura. Alguns estudos demonstraram que existe uma correlação positiva entre esses dois marcadores (LOHRI et al. 1997; PROVENCIO et al. 2003; DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU et al. 2008) mas poucos são estudos sobre Linfoma Folicular (HASHMI et al. 2014). Estas controvérsias podem estar relacionadas à grande heterogenidade dos tumores analisados, diferenças entre os métodos imunohistoquímicos utilizados, a interpretação dos dados, assim como o tempo de estocagem das amostras em parafina (NIELSEN et al. 2004).

A Top-2a também apresentou uma relação com outros marcadores de proliferação além do Ki-67. No estudo de BRIZOVA et al. (2010) em linfoma de células do manto, conseguiram demonstrar que existe uma relação linear entre TPX 2 e Top-2a. Neste estudo, os padrões de expressão dessas enzimas apresentaram-se similares durante todo ciclo celular. Por sua vez, o Ki-67 mostrou que a sua presença é dependente da duração da

fase G1 da proliferação. Com esses achados, os pesquisadores concluíram que a expressão de Top-2a e TPX 2 fornecem melhores estimativas das células cíclicas, podendo ser considerada um marcador de proliferação para um prognóstico clínico de pacientes com linfoma de células do manto comparado a expressão de Ki-67 (BRIZOVA et al. 2010).

No presente estudo retrospectivo, os resultados obtidos com relação a sobrevida e o risco de progressão relacionado ao gênero, idade e a presença de sintomas B (A sobrevida entre os pacientes com LF foi igual a 86,8% ; os pacientes idosos obtiveram sobrevida de 74,3% ; a presença de sintomas B aumentou o risco de óbito em 16 vezes e triplicou o risco de progressão tumoral) estão de acordo com a literatura, identificando que a amostra foi adequada para análise (CECYN et al. 2000; MAARTENSE et al. 2000; CRONIN-FENTON et al. 2006; HALLACK NETO et al. 2006; MOLLER et al. 2006; FARINHA et al. 2010; CONCONI et al. 2012).

Os pacientes que realizaram manutenção com imunobiológicos tiveram uma probabilidade de sobrevida em 22% maiores que os que não fizeram e não houve aumento da sobrevida livre de progressão. A literatura mostra que há um aumento da sobrevida livre de progressão para os que fizeram uso de imunobiológicos, mas não da sobrevida global (SALLES et al. 2011; VIDAL et al. 2017). Talvez esta diferença tenha ocorrido pelo fato que somente 55% dos pacientes fizeram manutenção com imunobiológicos, reduzindo a amostragem, e pelo fato que longo seguimento clínico ser necessário para avaliar diferenças significativas.

Avaliamos que os pacientes classificados com FLIPI de alto risco apresentaram probabilidade de permanecer sem progressão quase 20%

menor que os pacientes classificados com FLIPI de médio risco . A probabilidade mediana de sobrevida (tempo em que metade das pessoas acompanhadas evoluiu ao óbito) em pacientes classificados com FLIPI de alto risco ocorreu após 8 anos do diagnóstico. Estes dados são concordantes com os da literatura médica atual (SOLAL-CÉLIGNY et al. 2004; SWENSON et al. 2005).

Nosso estudo apresenta algumas limitações, por ser retrospectivo e também por conter uma população heterogênea, com tipos de tratamentos não homogêneos em que somente 55% da população recebeu manutenção com imunobiológicos.

Novos marcadores ainda representam um desafio no LF. Futuros trabalhos devem focar em exames de fácil acesso e reprodutibilidade. Isto abre uma perspectiva para um análise mais detalhada de marcadores de proliferação celular como Ki67 e Top2a, outros marcadores como p53 e novas tecnologias como painéis de expressão gênica (GLAS et al. 2005). É necessário o desenvolvimento de trabalhos prospectivos para que estes novos marcadores possam oferecer o melhor tratamento, no momento mais oportuno, de acordo com as práticas para que caminha a oncologia, no sentido de uma medicina personalizada.

Nosso estudo corrobora o Ki67 como um promissor fator prognóstico, sendo que sua expressão se relacionou com a sobrevida global. A Top2 a não se mostrou promissora neste estudo.

## 8 CONCLUSÃO

Nosso estudo apoia o valor da expressão de ki-67 e Top2a na **progressão da doença** em pacientes com linfoma folicular, uma vez que índices mais altos desses marcadores se relacionam significativamente com menor tempo de progressão da doença após a quimioterapia

Somente a **Ki-67 se relacionou significativamente com a sobrevida** global nesses pacientes, sendo que aqueles com índices mais altos apresentam sobrevida menos favorável

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. **Biologia molecular da célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. O ciclo celular; p.1055.

Al-tourah A, Chhanabhai M, Gill K, Hoskins P. Incidence, predictive factors and outcome of transformed lymphoma: a population-based study from British Columbia. **Ann Oncol** 2005; 16:64.

Al-tourah A, Gill K, Chhanabhai M, et al. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol** 2008; 26:5165-9.

Anderson T, Chabner BA, Young RC, et al. Malignant lymphoma I. The histology and staging of 473 patients at the national cancer institute. **Cancer** 1982; 50:2699-707.

Ansell SM. Non-Hodgkin Lymphoma: diagnosis and treatment. **Mayo Clin Proc** 2015; 90:1152-63.

Araf S, Koniali L, Heward J. Epigenetic dysregulation in follicular lymphoma. **Epigenomics** 2016; 8:77-84.

Araújo LHL, Victoriano APOS, Melo AC, et al. Linfoma Não-Hodgkin de alto grau: revisão da literatura. **Rev Bras Cancerol** 2008; 54:175-83.

Arisawa EAL, Moraes E, Rocha RF, Almeida JD. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67. Breve revisão. **Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos** 1999; 2:54-60.

Ashour ME, Atteya R, El-Khamisy SF. Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:137-51.

Bai B, Huang H-Q. Individualized management of follicular lymphoma. **Chinese Clin Oncol** 2015; 4:7.

Bar JK, Grelewski P, Noga L, Rabczyński J, Gryboś M, Jelen M. The association between the p53/ topoisomerase I and p53/ topoisomerase II $\alpha$  immunophenotypes and the progression of ovarian carcinomas. **Adv Clin Exp Med** 2012; 21:35-42.

Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. **Nat Rev Immunol** 2015; 15:172-84.

Bastion Y, Sebban C, Berger F, et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. **J Clin Oncol** 1997; 15:1587-94.

Berlin A, Castro-Mesta JF, Rodriguez-Romo L, et al. Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **Urol Oncol** 2017; 35:499-506.

Bloomfield CD, Arthur DC, Frizzera G, et al. Nonrandom chromosome abnormalities in lymphoma nonrandom chromosome abnormalities in lymphoma 1. **Cancer Res** 1983; 43:2975-84.

Brizova H, Kalinova M, Krskova L, Mrhalova M, Kodet R. A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II, and TPX2): an immunohistochemical correlation, testing, and optimizing for mantle cell lymphoma. **Virchows Arch** 2010; 456:671-9.

Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:164-71.

Brown D, Gatter K. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology** 1990; 17:489-503.

Broyde A, Boycov O, Strenov Y, Okon E, Shpilberg O, Bairey O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. **Am J Hematol** 2009; 84:338-43.

Bryant RJ, Banks PM, O'Malley DP. Ki67 staining pattern as a diagnostic tool in the evaluation of lymphoproliferative disorders. **Histopathology** 2006; 48:505-15.

Burden DA, Oshero N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. **Biochim Biophys Acta** 1998; 1400:139-54.

Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. Evolving concepts and practical applications The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. **Blood** 2011; 117:5019-32.

Carbone A, Gloghini A, Santoro A. In situ follicular lymphoma: pathologic characteristics and diagnostic features. **Hematol Oncol** 2012; 29:1-7.

Carreras J, López-Guillermo A, Fox BC, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. **Blood** 2006; 108:2957-64.

Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, et al. Early relapse of follicular lymphoma after Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: an analysis From the National LymphoCare Study. **J Clin Oncol** 2015; 33:2516-22.

Cecyn KZ, Oliveira JSR, Alves AC, Silva MRR, Kerbauy J. Prognostic factors in non-Hodgkin lymphomas. **Rev Paul Med** 2000; 118:7-12.

Chau I, Jones R, Cunningham D, et al. Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy? **Br J Cancer** 2003; 89:36-42.

Chen SL, Wu YS, Shieh HY, Yen C, Shen JJ, Lin KH. p53 is a regulator of the metastasis suppressor gene Nm23-H1. **Mol Carcinog** 2003; 214:204-14.

Cheson B, Horning S, Coiffier B, et al. Report of an International Workshop to standardized response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. **J Clin Oncol** 1999; 17:1244 [Erratum in: **J Clin Oncol** 2000; 18:2351].

Ciepliński K, Jóźwik M, Semczuk-Sikora A, et al. Expression of p53 and selected proliferative markers (Ki-67, MCM3, PCNA, and Topoisomerase II $\alpha$ ) in borderline ovarian tumors: correlation with clinicopathological features. **Histol Histopathol** 2018; 33:171-9.

Conconi A, Ponzio C, Lobetti-Bodoni C, et al. Incidence, risk factors and outcome of histological transformation in follicular lymphoma. **Br J Haematol** 2012; 157:188-96.

Cronin-Fenton DP, Sharp L, Deady S, Comber H. Treatment and survival for non-Hodgkin's lymphoma: Influence of histological subtype, age, and other factors in a population-based study (1999 - 2001). **Eur J Cancer** 2006; 42:2786-93.

Dave SS, Wright G, Ph D, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. **N Engl J Med** 2004; 351:2159-69.

Determann O, Hoster E, Ott G, et al. Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: Results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. **Blood** 2008; 111:2385-7.

Dhall D, Mertens R, Bresee C, et al. Ki-67 proliferative index predicts progression-free survival of patients with well-differentiated ileal neuroendocrine tumors. **Hum Pathol** 2012; 43:489-95.

Dillman RO. Radiolabeled anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-Cell Lymphoma. **J Clin Oncol** 2002; 20:3545-57.

Dingemans AC, Pinedo HM, Giaccone G. Clinical resistance to topoisomerase-targeted drugs. **Biochim Biophys Acta** 1998; 275-88.

Doussis-Anagnostopoulou IA, Vassilakopoulos TP, Thymara I, et al. Topoisomerase IIalpha expression as an independent prognostic factor in Hodgkin's lymphoma. **Clin Cancer Res** 2008; 14:1759-66.

Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in Follicular Lymphoma (FL). **Blood** 2005; 106:2169-74.

Farinha P, Kyle AH, Minchinton AI, Connors JM, Karsan A, Gascoyne RD. Vascularization predicts overall survival and risk of transformation in follicular lymphoma. **Haematologica** 2010; 95:2157-60.

Federico M, Bellei M, Marcheselli L, et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: A new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. **J Clin Oncol** 2009; 27:4555-62.

Filipovich AH, Mathur A, Kamat D, Shapiro RS. Primary Immunodeficiencies : genetic risk factors for lymphoma. **Cancer Res** 1992; 52:5465-8.

Fisher R, PM M, Harris N, Friedberg J. Non-Hodgkin's lymphoma. In: DeVita Jr VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.1957-7.

Friedberg JW, Taylor MD, Cerhan JR, et al. Follicular lymphoma in the United States: first report of National LymphoCare study. **J Clin Oncol** 2009; 27:1202-8.

Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. **Blood** 2005; 105:301-7.

Glas AM, Knoops L, Delahaye L, et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:390-8.

Glas AM, Kersten MJ, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. **Blood** 2005; 105: 301-307

Hall PA, Richards MA, Gregory V, D'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-hodgkin's lymphoma. **J Pathol** 1988; 154:223-35.

Hallack Neto AE, Pereira J, Beitler B, Llacer PD, Dulley FL, Chaoubah A. Results of CHOP chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. **Braz J Med Biol Res** 2006; 39:1315-22.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Harris LN, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues : report of the November 1997. **J Clin Oncol** 1999; 17:3835-49.

Hashmi AA, Hussain ZF, Faridi N, Khurshid A. Distribution of Ki67 proliferative indices among who subtypes of non-hodgkin's lymphoma: association with other clinical parameters. **Asian Pacific J Cancer Prev** 2014; 15:8759-63.

He X, Chen Z, Fu T, et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. **BMC Cancer** 2014; 14:153.

Herold M, Dölken G, Fiedler F, et al. Randomized phase III study for the treatment of advanced indolent non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and mantle cell lymphoma: chemotherapy versus chemotherapy plus rituximab. **Ann Hematol** 2003; 82:77-9.

Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. **N Engl J Med** 1984; 311:1471-5.

Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. **Cell** 2008; 111:558-65.

Hunault-Berger M, Ifrah N, Solal-Celigny P, et al. Intensive therapies in follicular non-Hodgkin lymphomas Review article Intensive therapies in follicular non-Hodgkin lymphomas. **Blood** 2009; 100:1141-52.

Janssen A, Schiffmann S, Birod K, et al. p53 is important for the anti-proliferative effect of ibuprofen in colon carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Comm** 2008; 365:698-703.

Jerkeman M, Anderson H, Dictor M, et al. Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patients with diffuse large B-cell lymphoma-a Nordic Lymphoma Group study. **Ann Hematol** 2004; 83:414-9.

Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. **Expert Rev Hematol** 2017; 10:1-11.

Jong D, Fest T. The microenvironment in follicular lymphoma. **Best Pract Res Clin Haematol** 2011; 2:135-46.

Jurinovic V, Kridel R, Staiger AM, Szczepanowski M et al. Clinicogenetic risk models predict early progression of follicular lymphoma after first-line immunochemotherapy. **Blood**. 2016 Aug;128(8):1112-20.

Kalpadakis C, Pangalis GA, Dimopoulou MN, et al. Rituximab monotherapy is highly effective in splenic marginal zone lymphoma. **Hematol Oncol** 2007; 25:127-31.

Kedmi M, Hedvat CV, Maragulia J, Zhang Z, Zelenetz AD. Association of quantitative assessment of the intrafollicular proliferation index with outcome in follicular lymphoma. **Br J Haematol** 2014; 164:646-52.

Kellner U, Sehested M, Jensen PB, Gieseler F, Rudolph P. Culprit and victim-DNA topoisomerase II. **Lancet Oncol** 2002; 3:235-43.

Khoury IF, Saliba RM, Giralt SA, et al. Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality. **Blood** 2001; 98:3595-9.

Kim E, Giese A, Deppert W. Wild-type p53 in cancer cells: When a guardian turns into a blackguard. **Biochem Pharmacol** 2009; 77:11-20.

Klapper W, Hoster E, Determann O, et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL network. **J Hematop** 2009; 2:103-11.

Korfi K, Ali S, Heward JA, Fitzgibbon J. Follicular Lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations Koorosh. **Epigenetics** 2017; 12:370-7.

Korkolopoulou P, Vassilakopoulos TP. Topoisomerase IIa as a prognostic factor in mantle cell lymphoma. **Ann Oncol** 2004; 18:1347-9.

Kretzmer H, Bernhart S, Wang W, et al. DNA methylome analysis in Burkitt and 18 follicular lymphomas identifies differentially methylated regions linked to somatic mutation and transcriptional control. **Nat Genet** 2015; 47:1316-25.

Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Review series pathogenesis of follicular lymphoma. **J Clin Invest** 2012; 122:3424-31.

Kridel R, Xerri L, Gelas-Dore B, et al. The prognostic impact of CD163-positive macrophages in follicular Lymphoma: a study from the BC cancer agency and the lymphoma study association. **Clin Cancer Res** 2015; 21:3428-35.

Krishnadasan R, Bifulco C, Kim J, et al.: Overexpression of SOCS3 is associated with increased survival in a cohort of patients with de novo follicular lymphoma. **Brit J Haematol** 2006; 135:72-75.

Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. **Mol Med Reports** 2015; 11:1566-72.

Li S, Feng X, Li T, et al. Extranodal NK / T-cell lymphoma, nasal type: a report of 73 cases at MD Anderson Cancer Center. **Am J Surg Pathol** 2013; 37:14-23.

Link BK, Friedberg JW, Taylor MD, et al. Follicular lymphoma in the United States: first report of the national LymphoCare study. **J Clin Oncol** 2009; 27:1202-8.

Logsdon MD, Meyn Jr RE, Besa PC, et al. Apoptosis and the Bcl-2 gene family- pattern of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1999; 44:19-29.

Lohri A, Reuter J, Gudat F, Herrmann R. Topoisomerase II alpha mRNA and tumour cell proliferation in non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Pathol** 1997; 50:22-6.

Lossos IS, Levy R. Higher grade transformation of follicular lymphoma: phenotypic tumor progression associated with diverse genetic lesions. **Semin Cancer Biol** 2003; 13:191-202.

Maartense E, Kluin-nelemans HC, Cessie S, Kluin PM, Snijder S, Noordijk EM. Different age limits for elderly patients with indolent and aggressive non-hodgkin lymphoma and the role of relative survival with increasing age. **Cancer** 2000; 89:2667-76.

Mamessier E, Broussais-Guillaumot F, Chetaille B, et al. Nature and importance of follicular lymphoma precursors. **Haematologica** 2014; 99:802-10.

Marcus R, Davies A, Ando K, et al. Obinutuzumab for the first-line treatment of follicular lymphoma. **N Engl J Med** 2017; 377:1331-44.

Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, et al. Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma. **Blood** 1995; 85:3671-8.

Martin P, Byrtek M, Dawson K, et al. Patterns of delivery of chemoimmunotherapy to patients with follicular lymphoma in the United States: results of the National LymphoCare Study. **Cancer** 2013; 119:4129-36.

Maurer MJ, Bachy E, Ghesquières H, et al. Early event status informs subsequent outcome in newly diagnosed follicular lymphoma. **Am J Hematol** 2016; 91:1096.

Maximov GK, Maximov KG. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. **Biotechnol Biotechnol Equip** 2008; 22:664-8.

McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program. **J Clin Oncol** 1998; 16:2825-33.

Melo N, Matutes E, Cordone I, Morilla R, Catovsky D. Expression of Ki-67 nuclear antigen in B and T cell lymphoproliferative disorders. **J Clin Pathol** 1992; 66:660-3.

Menendez D, Inga A, Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:724-37.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2018 incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. [2018 ago. 27]

Moller MB, Perderson NT, Christensen BE. Conditional survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Cancer** 2006; 106:2165-2110.

Montoto S, Davies AJ, Matthews J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:2426-33.

Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. **Blood** 2006; 107:265-76.

Mugnaini EN, Ghosh N. B cell Lymphoma in the tricuspid valve . **Prim Care** 2016; 43:661-75.

[NCI]. National Cancer Institute National Institute of Health. **Cancer stat fact sheets.** 2017. p.2. Available from: <URL:<http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html>> [2017 jul 12].

[NCI] National Cancer Institute. **Surveillance, Epidemiology, and End Results Program.** 2018. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html>

Naz E, Mirza T, Aziz S, Ali A, Danish F. Correlation of ki 67 proliferative index with clinical and pathological features on tissue sections of non hodgkins lymphoma by immunostaining. **J Pak Med Assoc** 2011; 61:748-52.

Nielsen JS, Jakobsen E, Hølund B, Bertelsen K, Jakobsen A. Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2004; 14:1086-96.

O'Shea D, O'Riain C, Taylor C, et al.: The presence of p53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. **Blood** 2008; 112: 3126-9.

Oliveira GMM, Martins WA. O preço da obesidade. **Rev Bras Cardiol** 2013; 26:2012-4.

Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death Differ** 2003; 10:431-42.

Pampalona J, Frías C, Genescà A, Tusell L. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. **PLoS Genet** 2012; 8:e1002679.

Park SE, Min YK, Ha J Du, Kim BT, Lee WG. Novel small molecule induces p53-dependent apoptosis in human colon cancer cells. **Biochem Biophys Res Comm** 2007; 358:842-7.

Pasqualucci L, Dominguez-sola D, Chiarenza A, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. **Nature** 2012; 471:189-95.

Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. **Lancet Oncol** 2015; 16:1111-22.

Payandeh M, Sadeghi M, Sadeghi E. The Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma: role and prognostic significance. **Am J Cancer Prev** 2015; 3:100-2.

Pedersen MO, Poulsen TS, Gang AO, et al. Lack of topoisomerase copy number changes in patients with de novo and relapsed diffuse large B-cell lymphoma. **Exp Hematol** 2015; 43:534-6.

Peres AL, Paz e Silva KM, de Araújo RFF, et al. Immunocytochemical study of TOP2A and Ki-67 in cervical smears from women under routine gynecological care. **J Biomed Sci** 2016; 23:42.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. TP53 Impact of Mutant p53 Functional Properties on Mutation Patterns and Tumor Phenotype: Lessons from Recent Developments in the IARC TP53 Database. **Hum Mutat** 2007; 28:622-9.

Provencio M, Corbacho C, Salas C, et al. The topoisomerase IIalpha expression correlates with survival in patients with advanced Hodgkin's lymphoma. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1406-11.

Provencio M, Sabín P, Gomez-Codina J, et al. Impact of treatment in long-term survival patients with follicular lymphoma: A Spanish Lymphoma Oncology Group registry. **PLoS One** 2017; 12:1-14.

Rahmanzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. **Cell Prolif** 2007; 40:422-30.

Relander T, Johnson NA, Farinha P, Connors JM, Sehn LH, Gascoyne RD. Prognostic factors in follicular lymphoma. **J Clin Oncol** 2010; 28:2902-13.

Rody A, Karn T, Ruckhaberle E, et al. Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 113:457-66.

Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. **Histopathology** 2011; 58:4-14.

Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, Gauduchon P. Long-term clonal persistence and evolution of t (14 ;18) - bearing B cells in healthy individuals. **Leukemia** 2006; 20:158-62.

Rowley JD. Chromosome studies in the non-Hodgkin's lymphomas: the role of the 14; 18 translocation. **J Clin Oncol** 1988; 6:919-25.

Salles G, Seymour JF, Offner F, et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. **Lancet** 2011; 377:42-51.

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

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein : from the known and the unknown. **J Cell Physiol** 2000; 322:311-22.

Schulz H, Bohlius J, Skoetz N, et al. Chemotherapy plus Rituximab versus chemotherapy alone for B-cell non- Hodgkin's lymphoma. **Cochrane Database Syst Rev** 2007; (4):CD003805.

Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. **Blood** 2007; 109:1857-62.

Seifert M, Scholtysik R, Küppers R. Origin and pathogenesis of b cell lymphomas. **Methods Mol Biol** 2013; 971:1-26.

Seymour JF, Pro B, Fuller LM, et al. Long-term follow-up of a prospective study of combined modality therapy for stage I-II indolent non-Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol** 2003; 21:2115-22.

Smith SM. Dissecting follicular lymphoma: high versus low risk. **Hematol Am Soc Hematolo Educ Program** 2013; 2013:561-7.

Solal-Céligny P, Lepage E, Brousse N, et al. Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alfa-2b for advanced follicular lymphomas: final analysis of survival and toxicity in the groupe d'étude des lymphomes folliculaires 86 trial. **J Clin Oncol** 1998; 16:2332-8.

Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, et al. FLIPI: Follicular Lymphoma International Prognostic Index. **Blood** 2004; 104:1258-65.

Swenson WT, Wooldridge JE, Lynch CF, Forman-hoffman VL, Chrischilles E, Link BK. Improved survival of follicular lymphoma patients in the United States. **J Clin Oncol** 2005; 23:5019-26.

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood** 2016; 127:2375-2390

Tadbir AA, Pardis S, Ashkavandi ZJ, et al. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors. **Asian Pacific J Cancer Prev** 2012; 13:5155-9.

Takata K, Miyata-Takata T, Sato Y, Yoshino T. Pathology of follicular lymphoma. **J Clin Exp Hematop** 2014; 54:3-9.

Tang B, Malysz J, Douglas-Nikitin V, et al. Correlating metabolic activity with cellular proliferation in follicular lymphomas. **Mol Imaging Biol** 2009; 11:296-302.

Tholstrup D, Brown P de N, Jurlander J, Jeppesen PB, Groenvold M. Quality of life in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with dose-dense chemotherapy is only affected temporarily. **Leuk Lymphoma** 2011; 52:400-8.

Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. **Br J Haematol** 2005; 131:29-38.

Torlakovic EE, Bilalovic N, Golouh R, et al.: Prognostic significance of PU.1 in follicular lymphoma. **J Pathol** 2006; 209:252-359.

van de Schans SAM, Steyerberg EW, Nijziel MR, Creemers GJ, Janssen-Heijnen ML, van Spronsen DJ. Validation, revision and extension of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI ) in a population-based setting. **Ann Oncol** 2009; 20:1697-702.

Vidal L, Gafter-Gvili A, Salles G, et al. Rituximab maintenance improves overall survival of patients with follicular lymphoma-Individual patient data meta-analysis. **Eur J Cancer** 2017; 76:216-25.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. **Nature** 2000; 408:307-10.

Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. **Br J Haematol** 2012; 156:225-33.

Wang Q, Zambetti GP, Suttle DP. Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by the p53 tumor suppressor. **Mol Cell Biol** 1997; 17:389-97.

Yamamoto E, Tomita N, Sakata S, et al. MIB-1 labeling index as a prognostic factor for patients with follicular lymphoma treated with rituximab plus CHOP therapy. **Cancer Sci** 2013; 104:1670-4.

Yan J, Liu XL, Han LZ, et al. Relation between Ki-67, ER, PR, Her2/neu, p21, EGFR, and TOP II- $\alpha$  expression in invasive ductal breast cancer patients and correlations with prognosis. **Asian Pacific J Cancer Prev** 2015; 16:823-9.

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer : prognostic and predictive potential. **Lancet Oncol** 2010; 11:174-83.

Yuen AR, Kamel OW, Halpern J, Horning SJ. Long-term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma. **J Clin Oncol** 1995; 13:1726-33.

Zeggai S, Harir N, Tou A, Sellam F, Mrabent MN, Salah R. Immunohistochemistry and scoring of Ki-67 proliferative index and p53 expression in gastric B cell lymphoma from Northern African population: a pilot study. **J Gastrointest Oncol** 2016; 7:462-8.

Zola FE. **Expressão da topoisomerase II alpha e do HER-2/neu como fatores preditivos de resposta clínica e patológica em pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante.** São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Universidade de São Paulo].

Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta** 2001; 1551:F1-37.